

Translation
10/009

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

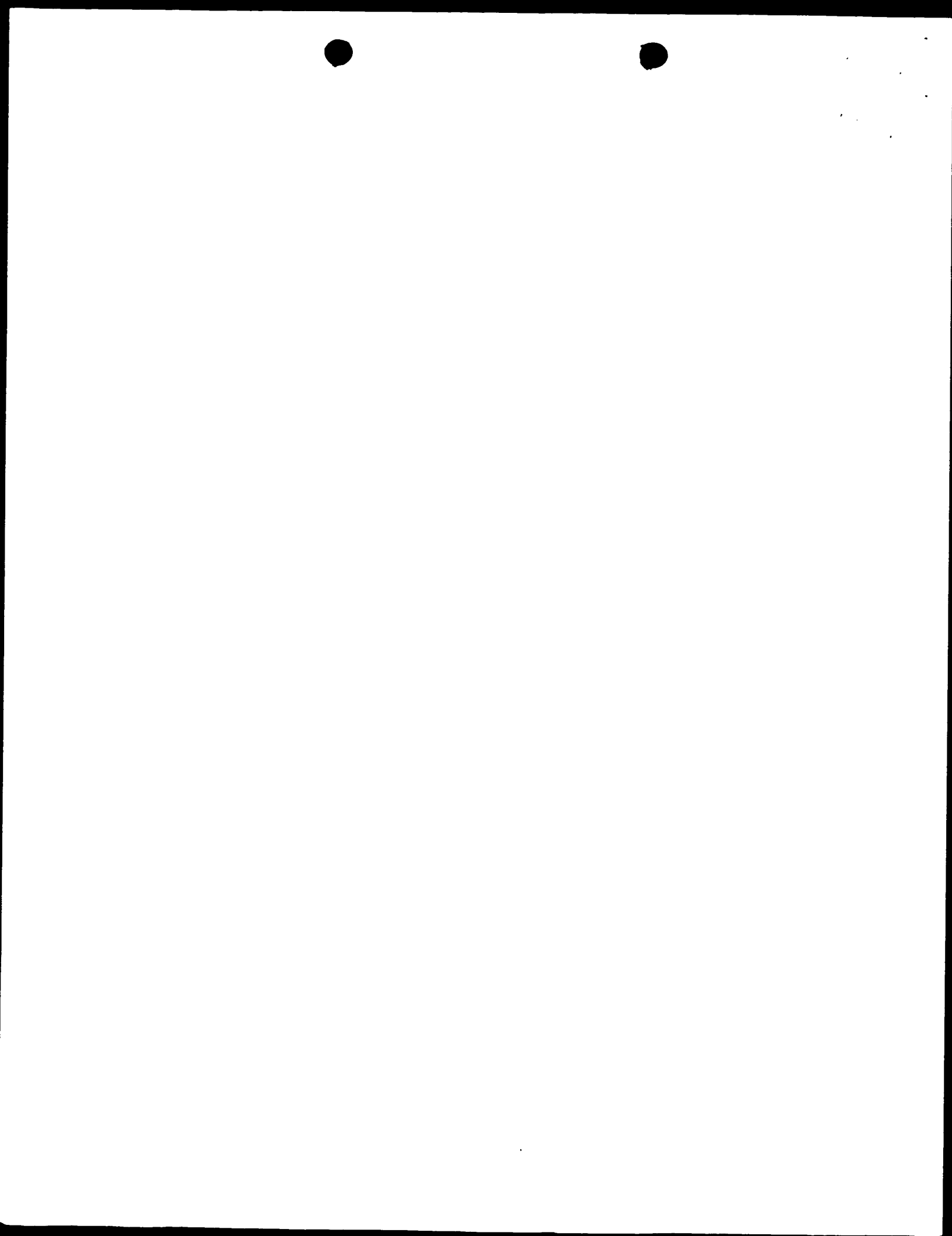
Applicant's or agent's file reference 4894PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01612	International filing date (day/month/year) 09 June 2000 (09.06.00)	Priority date (day/month/year) 11 June 1999 (11.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 31/04		
Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS		

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 11 sheets, including this cover sheet.
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of _____ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 December 2000 (27.12.00)	Date of completion of this report 07 November 2001 (07.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01612

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-25 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-8 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/9-9/9 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

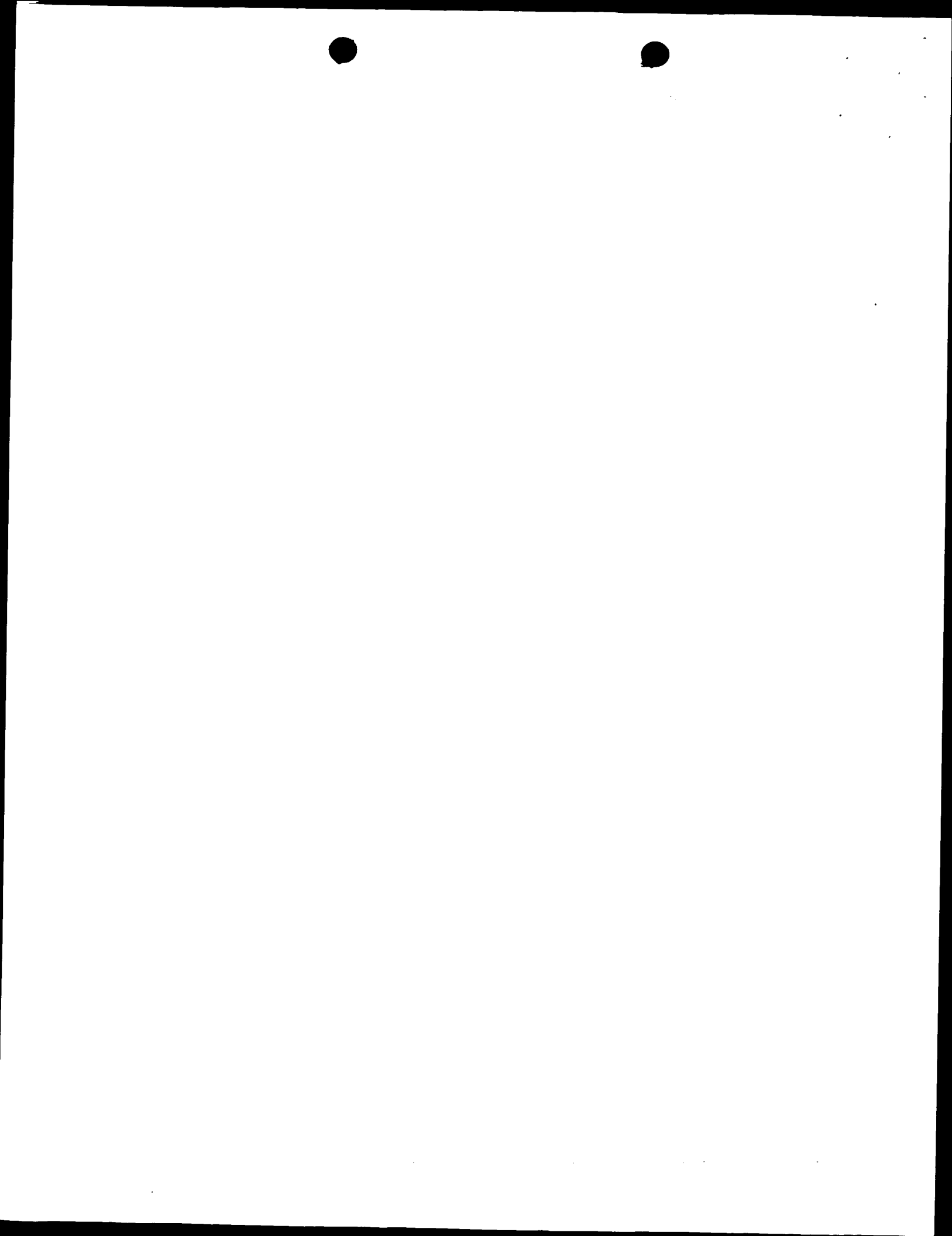
4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01612

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 1-8

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 1-8

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01612

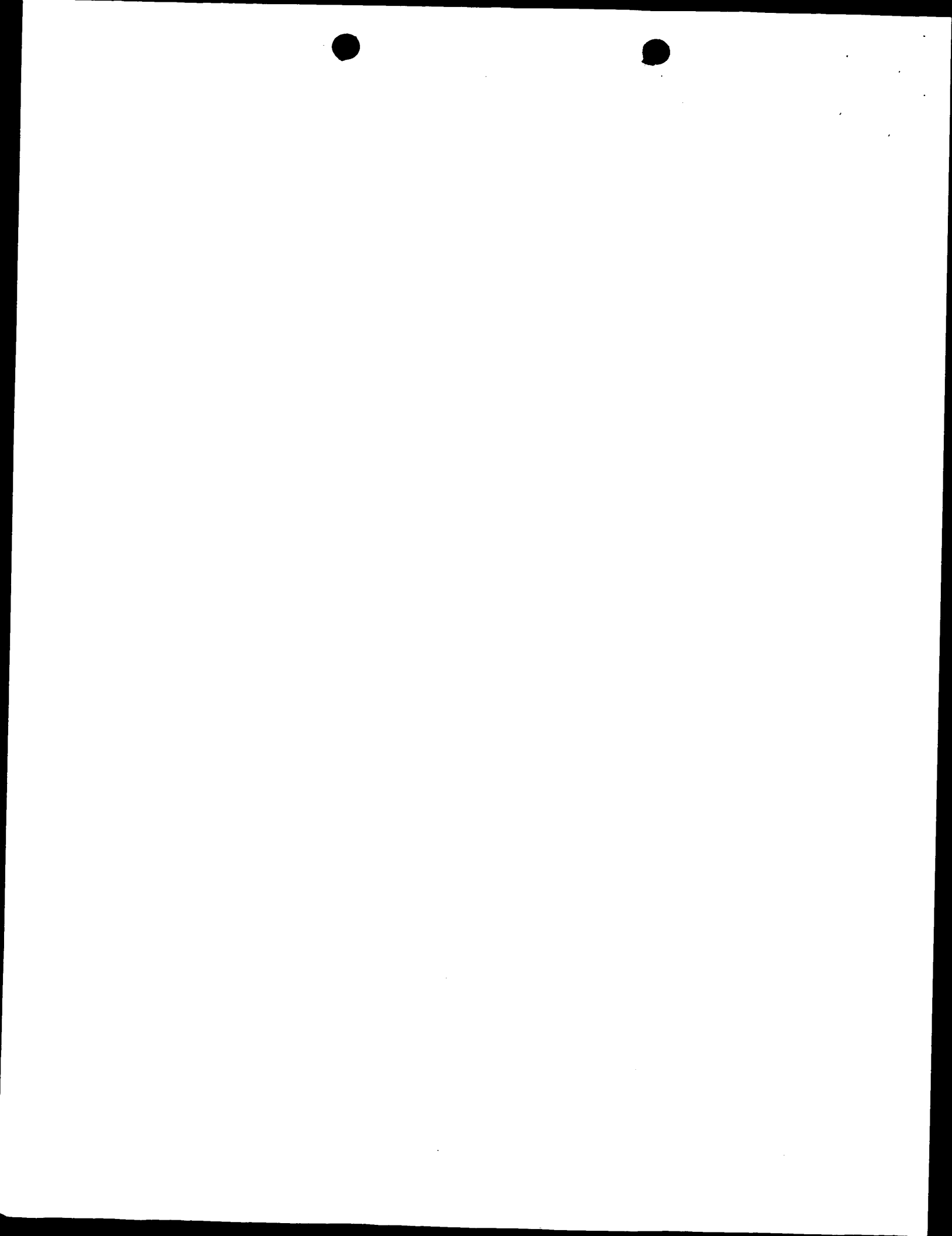
Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box III

1 Claims 1-8 concern a use/composition defined (*inter alia*) by the following parameters: a compound capable of releasing or inducing the release of NO. The search has been confined to the compounds specifically mentioned in the claims (NO, L-arginine). Furthermore, it is not clear which diseases are encompassed by the definition "disease resulting from deficiency of an adult gene in a person possessing a foetal gene homologous to said adult gene". Consequently, the search has been confined to the conditions specified in the claims, namely, Duchenne and Becker muscular dystrophy, thalassanemia and sickle cell disease (see PCT ISA 210).

1.1 The applicant should note that a preliminary examination report need not be provided for claims or parts of claims relating to inventions for which no search report has been established (PCT Rule 66.1); consequently, Claims 1-8 have only been examined in part.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01612

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

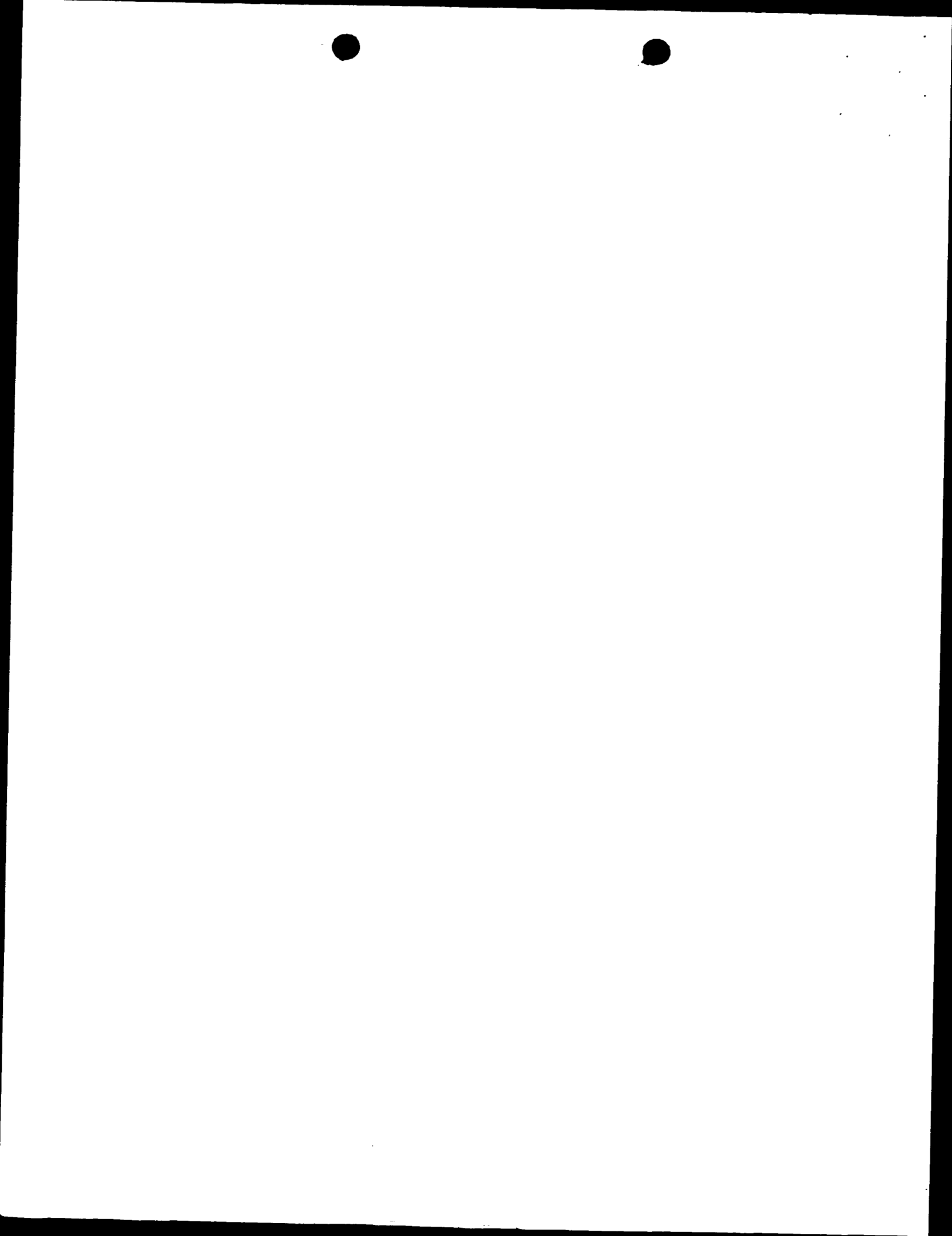
1. Statement

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-8	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

2 The following documents are referred to:

- D1 WO-A-97/33173 (UNIV CALIFORNIA) 12 September 1997 (1997-09-12)
- D2 DE-U-297 09 820 (NUTREND S R O) 31 July 1997 (1997-07-31)
- D3 WO-A-96/02241 (UNIV DUKE; HARVARD COLLEGE (US)) 1 February 1996 (1996-02-01)
- D4 WO-A-99/01427 (HRABIE JOSEPH A.; KEEFER LARRY K. (US); GOVERNMENT OF THE UNITED STATES) 14 January 1999 (1999-01-14)
- D5 WO-A-98/13358 (BOGDAN CHRISTIAN; SAAVEDRA JOSEPH E. (US); JI XINHUA (US); US GOVER) 2 April 1998 (1998-04-02)
- D6 EP-A-0 870 763 (ONO PHARMACEUTICAL CO) 14 October 1998 (1998-10-14)
- D7 YAMADA, SHUICHI: "Effects of ATP and amino acid mixtures on progressive muscular dystrophy", SAPPORO IGAKU ZASSHI (1965), 27, 284-97, XP002131218
- D8 BREDT D.S.: "Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology", FREE RADICAL RESEARCH, (1999), 31/6 (577-596), XP002131219



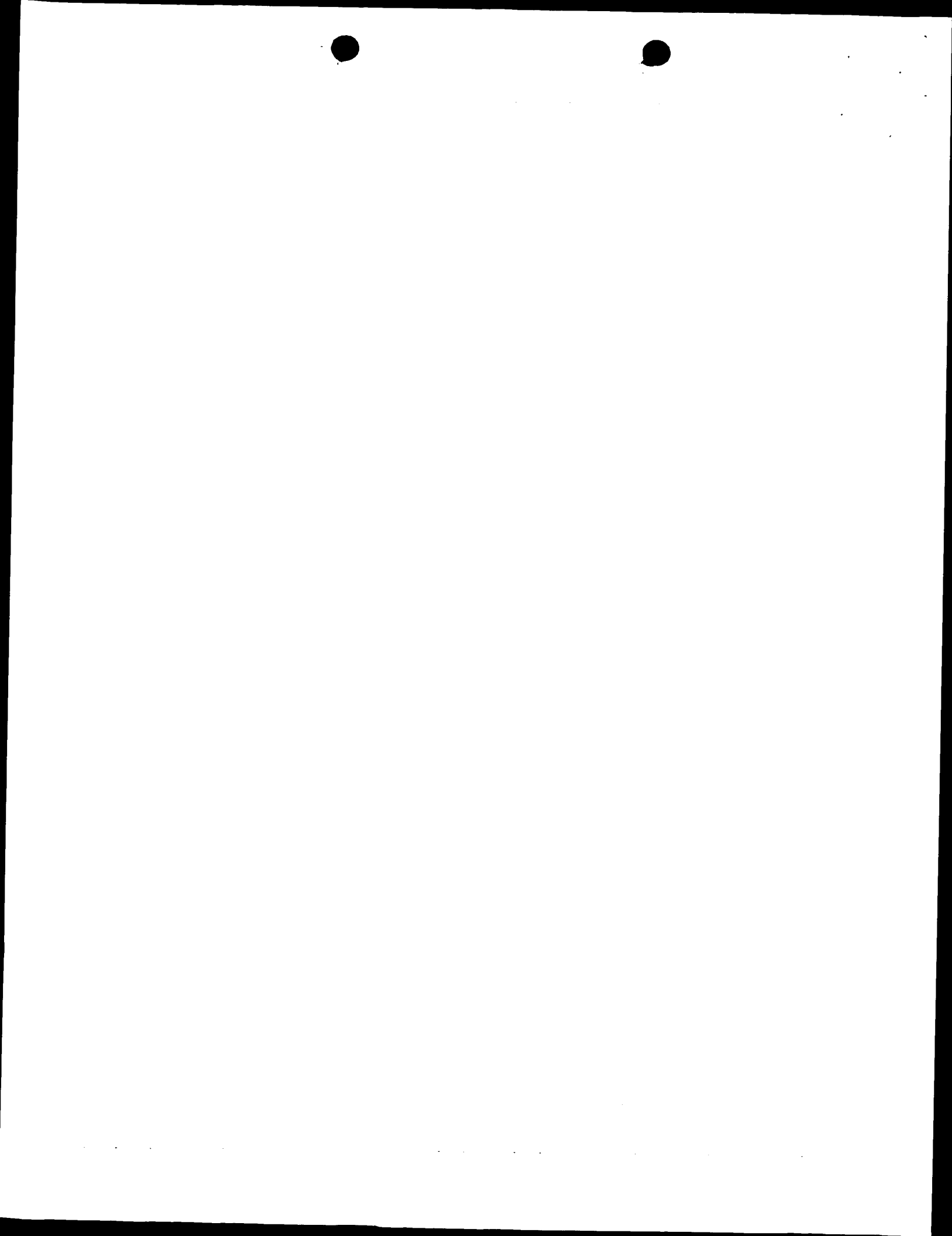
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01612

- D9 HAYCOCK J.W. ET AL.: "Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy", NEUROREPORT, (1996 DEC 20) 8(1) 357-61, XP000879014
- D10 CHAO DANIEL S. ET AL.: "Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy", J. EXP. MED. (1996), 184(2), 609-618, XP000879016
- D11 LAINE, ROMUALD ET AL.: "Neuronal nitric oxide synthase isoforms α and μ are closely related calpain-sensitive proteins", MOL. PHARMACOL. (1998), 54(2), 305-312, XP000879162
- D12 DECROUY A. ET AL.: "Mini- and full-length dystrophin gene transfer induces the recovery of nitric oxide synthase at the sarcolemma of mdx4cv skeletal muscle fibers", GENE THER. (1998), 5(1), 59-64, XP000879023
- D13 AZZENA G.B. ET AL.: "Nitric oxide regenerates the normal colonic peristaltic activity in mdx dystrophic mouse", NEUROSCIENCE LETTERS, (1999 FEB 12) 261(1-2), 9-12, XP000879028
- D14 THOMAS G.D. ET AL.: "Impaired metabolic modulation of α -adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998) 95/25 (15090-15095), XP002131220
- D15 CHAUBOURT E. ET AL.: "Nitric oxide and L-arginine cause an accumulation of utrophin at the sarcolemma: A possible compensation for dystrophin loss in Duchenne muscular dystrophy", NEUROBIOLOGY OF DISEASE, (1999) 6/6 (499-507), XP002131221
- D16 WO-A-97/25984 (SCHERING AG; UNIV. TEXAS (US)) 24 July 1997 (1997-07-24)

- D17 WAUGH WILLIAM H. ET AL.: "Evidence that L-arginine is a key amino acid in sickle cell anemia - a preliminary report", NUTR. RES. (N.Y.) (1999), 19(4), 501-518, XP000972387
- D18 SCHECHTER A.N.: "NO Therapy", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1997) 100/5 (955-956), XP001028163
- D19 HEAD C. ALVIN ET AL.: "Low concentrations of nitric oxide increase oxygen affinity of sickle erythrocytes in vitro and in vivo", J. CLIN. INVEST. (1997), 100(5), 1193-1198, XP001028165
- D20 PERRINE S.P. ET AL.: "BUTYRATE-INDUCED REACTIVATION OF THE FETAL GLOBIN GENES: A MOLECULAR TREATMENT FOR THE HEMOGLOBINOPATHIES", EXPERIENTIA, BIRKHAUSER VERLAG., BASEL, CH, Vol. 49, N° 2, 15 February 1993 (1993-02-15), pages 133-137, XP000564590, ISSN: 0014-4754
- D21 WO-A-95/28377 (ABBOTT LAB) 26 October 1995 (1995-10-26)
- D22 US-A-5 885 621 (HEAD C. ALVIN ET AL.) 23 March 1999 (1999-03-23)
- D23 PACELLI R. ET AL.: "Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide [6]", LANCET, (1996) 347/9005 (900), XP001028057
- D24 MORRIS C. ET AL.: "Effects of L-arginine therapy on nitric oxide production in patients with sickle cell disease", BLOOD, (NOV. 15 1998) VOL. 92, NO. 10, SUPPL. 1, PART 1-2, PP. 695A. MEETING INFO.: 40TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, MIAMI BEACH, FLORIDA, USA, DECEMBER 4-8, 1998, THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, XP001028060
- D25 ENWONWU C.O.: "Increased metabolic demand for arginine in sickle cell anemia", MED. SCI. RES. (1989), 17(23), 997-8, XP001028048



- D26 SHER G.D. ET AL.: "Extended therapy with intravenous arginine butyrate in patients with β -hemaglobinopathies", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, (1995) 332/24 (1606-1610), XP001028051
- D27 MORRIS CLAUDIA R. (1) ET AL.: "L-arginine therapy paradoxically decreases nitric oxide production in patients with sickle cell disease", PEDIATRIC RESEARCH, (APRIL 1999) VOL. 45, NO. 4 PART 2, PP. 150A. MEETING INFO.: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PEDIATRIC SOCIETY AND THE SOCIETY FOR PEDIATRIC RESEARCH, SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA, MAY 1-4 1999, XP001028052
- D28 ATZ A.M. ET AL.: "Inhaled nitric oxide in sickle cell disease with acute chest syndrome", ANESTHESIOLOGY, (1997 OCT) 87(4) 988-90, XP001028046.

NOVELTY - PCT Article 33(1) and (2)

- 3 Claims 1-8 are not novel in the light of the prior art documents cited in the search report.

- 3.1 D1 (page 1, lines 7-23; page 2, line 2, to page 5, line 15; page 7, lines 15-22; page 11, line 32, to page 13, line 20; page 27, line 12, to page 29, line 13): NO for treating muscular dystrophy (Duchenne, Becker) by restoring a functional molecule of dystrophin (gene therapy).

Claims 1-5 and 7-8 are therefore not novel.

- 3.2 D2 (page 1, line 28, to page 2, line 17; Example 1; page 4, lines 19-29): L-arginine for treating muscular

dystrophy.

Claims 1-5 and 7-8 are therefore not novel.

- 3.3 D3 (Example 4; page 3, paragraph 2; Claims 10 and 30-32; page 5, paragraph 2; page 9, paragraph 3, to page 10, paragraph 1; page 14, paragraph 3, to page 15, paragraph 1): exogenous NO-providing compounds (and likewise NO) reduce muscular contraction; NOS-inhibitors (arginine analogues) for the treatment of muscular dystrophy.

Claims 1-5 and 7-8 are therefore not novel.

- 3.4 D4 (page 27, line 34, to page 43, line 8): amidines (compounds capable of releasing NO) for the treatment of diseases (e.g. genetic diseases) which can be treated using NO.

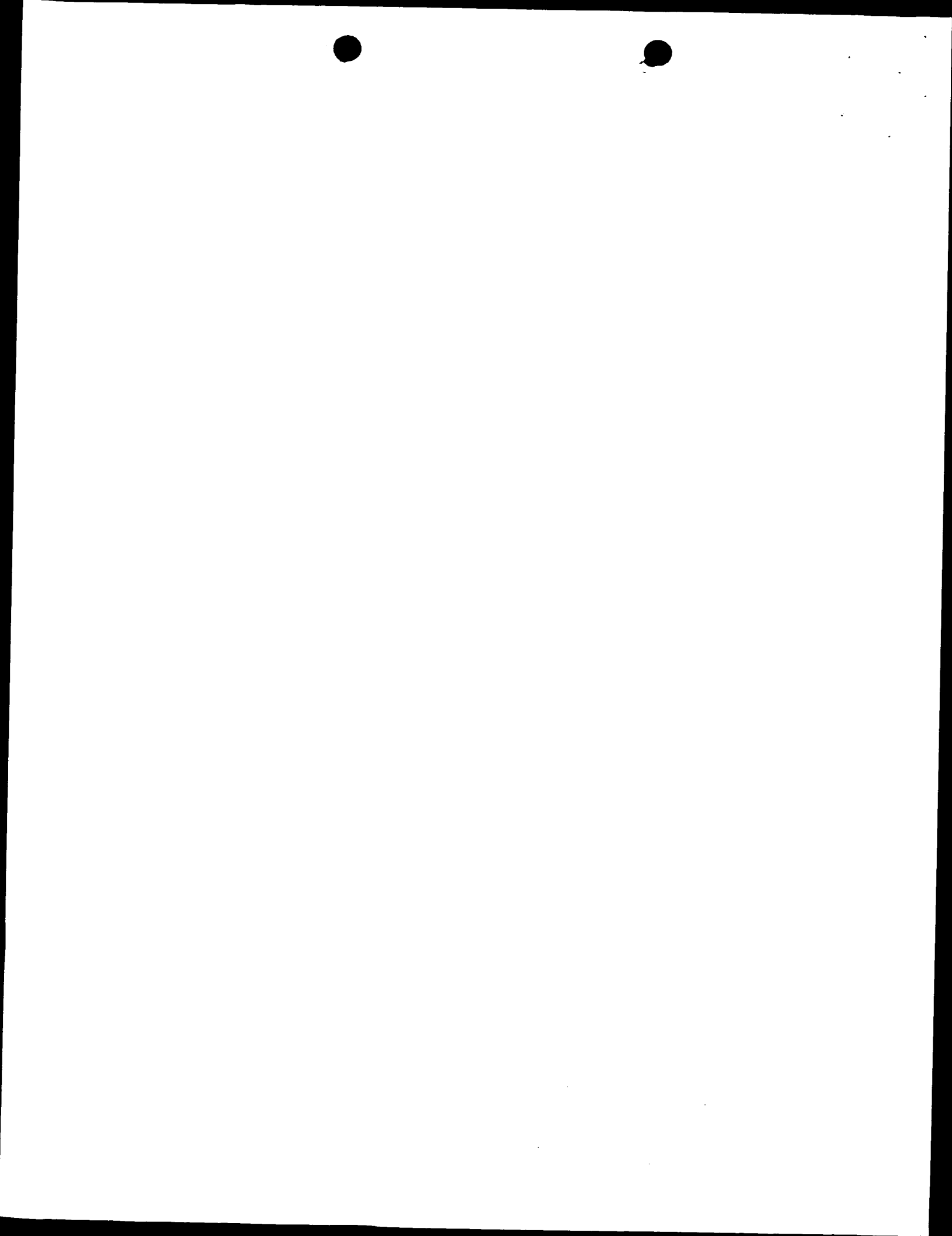
Claims 1-3 and 8 are therefore not novel.

- 3.5 D5 (page 1, lines 16-29; page 42, line 34, to page 43, line 8): diazenium diolates (compounds capable of releasing NO) for the treatment of diseases (e.g. genetic diseases) which can be treated using NO.

Claims 1-3 and 8 are therefore not novel.

- 3.6 D6 (page 14, lines 1-15): NOS-inhibitors (e.g. L-arginine and analogues) for the treatment and/or prevention of diseases induced by NOS, such as muscular dystrophy.

Claims 1-3, 5 and 7-8 are therefore not novel.



- 3.7 D7 (abstract): arginine for the treatment of muscular dystrophy.

Claims 1-5 and 7-8 are therefore not novel.

- 3.8 D9 (abstract; page 357, column 2, paragraph 2, to page 358, column 1, paragraph 2; page 361, column 1, paragraph 2, to page 362, column 2, paragraph 2): NO and NO-providers (e.g. L-arginine) have a role in protecting against the effects of free radicals contributing to Duchenne muscular dystrophy.

Claims 1-5 and 7-8 are therefore not novel.

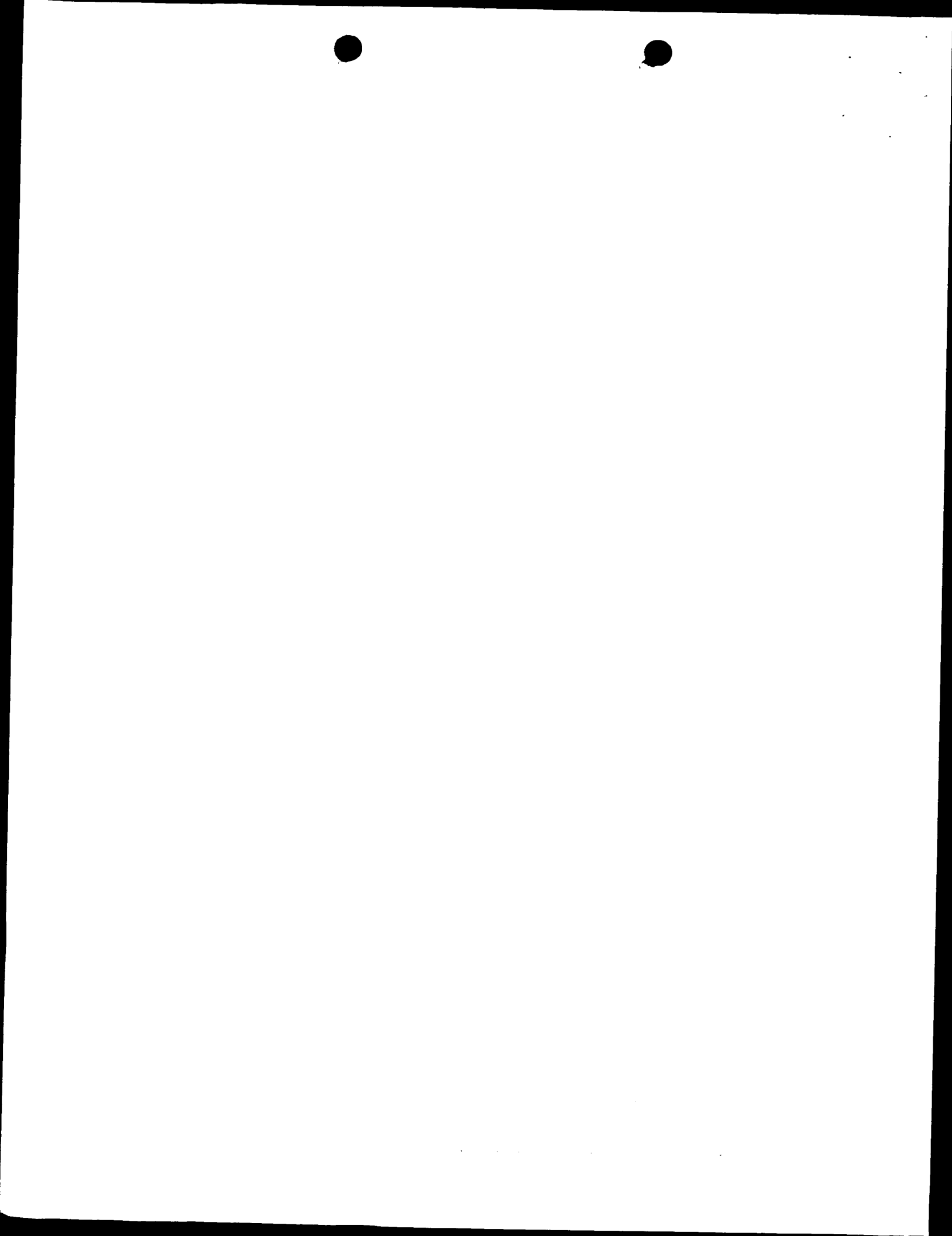
- 3.9 D13 (abstract; page 9, column 1, paragraph 1, to page 12, column 1 paragraph 1): L-arginine regenerates the motor pattern in mdx dystrophic mice (Duchenne muscular dystrophy model), which indicates that the anomalies in the mdx mice are due to endogenous changes of NO (absence of dystrophin).

Claims 1-5 and 7-8 are therefore not novel.

- 3.10 D14 (abstract; page 15091, column 1, paragraph 3; page 15091, column 2, paragraph 2, to page 15092, column 2, paragraph 1; Figure 1; page 15094, column 1, paragraph 2, to column 2, paragraph 1; page 15095, column 1, paragraphs 3-4): mdx dystrophic mice (Duchenne muscular dystrophy model); role of NO and of NOS.

Claims 1-3, 5 and 7-8 are therefore not novel.

- 3.11 D16: NOS substrates (e.g. L-arginine), NOS-providers for the treatment and prevention of urinary incontinence.



Claims 1-3 and 8 are therefore not novel.

- 3.12 D17: L-arginine for the treatment of falciform anemia (drepanocytosis).

Claims 1-4 and 6-8 are therefore not novel.

- 3.13 D18: NO and NO-providing compounds such as L-arginine for the treatment of falciform anemia (drepanocytosis).

Claims 1-4 and 6-8 are therefore not novel.

- 3.14 D19 (abstract): NO for the treatment of falciform anemia (drepanocytosis).

Claims 1-3 and 6-8 are therefore not novel.

- 3.15 D20 (abstract): butyric acid and butyric derivatives (arginine butyrate) for inducing the production of foetal hemoglobin (treatment of thalassanemia).

Claims 1-3 and 6-8 are therefore not novel.

- 3.16 D21 (page 6, line 20, to page 7, line 2): NOS-regulators for the treatment of falciform anemia (drepanocytosis), for example.

Claims 1-3 and 6-8 are therefore not novel.

- 3.17 D22 (column 2, line 35, to column 6, line 40; Claims 1-52): NO or NO-releasing compounds for the treatment of hemoglobinopathies (including thalassanemia, for example).

Claims 1-3 and 6-8 are therefore not novel.

- 3.18 D23 (abstract): hydroxyurea for the treatment of falciform anemia (drepanocytosis).

Claims 1-3 and 6-8 are therefore not novel.

- 3.19 D24 (abstract): L-arginine / NO for the treatment of falciform anemia (drepanocytosis).

Claims 1-4 and 6-8 are therefore not novel.

- 3.20 D25: falciform anemia (drepanocytosis) characterised by L-arginine deficiency.

- 3.21 D26 (abstract): intravenous injection of arginine (arginine butyrate) for the treatment of thalassanemia and drepanocytosis.

Claims 1-3 and 6-8 are therefore not novel.

- 3.22 D27 (abstract): administration of L-arginine to patients suffering from drepanocytosis.

Claims 1-4 and 6-8 are therefore not novel.

- 3.23 D28: beneficial effect of NO on patients suffering from drepanocytosis.

Claims 1-3 and 6-8 are therefore not novel.

INVENTIVE STEP - PCT Article 33(1) and (3)

4 Claims 1-8, which are not novel, cannot be considered to involve an inventive step.


4.1 The use of NO, or L-arginine, or other NO-providers, or compounds capable of releasing NO for the treatment of the diseases specified in Claim 7 of the present application is known and/or anticipated by the documents cited in the search report.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 4894PCT	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01612	Date du dépôt international (jour/mois/année) 09/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 11/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K31/04		
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE... et al.		
1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36. 2. Ce RAPPORT comprend 17 feuilles, y compris la présente feuille de couverture. <input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT). Ces annexes comprennent feuilles.		
3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants: I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input checked="" type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 27/12/2000	Date d'achèvement du présent rapport 07.11.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Fayos, C N° de téléphone +49 89 2399 2180	



RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01612

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-25 version initiale

Revendications, N°:

1-8 version initiale

Dessins, feuilles:

1/9-9/9 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01612

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

1. La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
- ☒ les revendications n°s 1-8 all partially.

parce que :

- ☐ la demande internationale, ou les revendications n°s en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
 - ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
 - ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
 - ☒ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s 1-8 all partially en question.
2. Le listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés n'est pas conforme à la norme prévue dans l'annexe C des instructions administratives, de sorte qu'il n'est pas possible d'effectuer un examen préliminaire international significatif:
- ☐ le listage présenté par écrit n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.



**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01612

☐ le listage sous forme déchiffrable par ordinateur n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications -
	Non : Revendications 1-8
Activité inventive	Oui : Revendications -
	Non : Revendications 1-8
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-8
	Non : Revendications -

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

Concernant le point III

Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

- 1- Les revendications 1-8 ont trait à une utilisation / composition définie (entre autres) au moyen des paramètres suivants: un composé capable de libérer ou d'induire la libération de NO. La recherche a été limitée aux composés spécifiquement mentionnés dans les revendications (NO, L-arginine). De plus, il n'est pas clair quelles maladies il faut entendre par la définition "maladie résultant de la déficience d'un gène adulte chez un individu possédant un gène foetal homologue audit gène adulte". Par conséquent, la recherche a été limitée aux affections spécifiés dans les revendications, c'est à dire la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker, la thalassémie et la drépanocytose (voir PCT ISA 210).
- 1.1- L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties des revendications ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT), donc les revendications 1-8 ont été examinées partiellement.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

- 2- Il est fait référence aux documents suivants:

- D1 WO 97 33173 A (UNIV CALIFORNIA) 12 septembre 1997 (1997-09-12)
- D2 DE 297 09 820 U (NUTREND S R O) 31 juillet 1997 (1997-07-31)
- D3 WO 96 02241 A (UNIV DUKE ;HARVARD COLLEGE (US)) 1 février 1996 (1996-02-01)
- D4 WO 99 01427 A (HRABIE JOSEPH A ;KEEFER LARRY K (US); GOVERNMENT OF THE UNITED STA) 14 janvier 1999 (1999-01-14)
- D5 WO 98 13358 A (BOGDAN CHRISTIAN ;SAAVEDRA JOSEPH E (US); JI XINHUA



- (US); US GOVER) 2 avril 1998 (1998-04-02)
- D6 EP-A-0 870 763 (ONO PHARMACEUTICAL CO) 14 octobre 1998 (1998-10-14)
- D7 YAMADA, SHUICHI: 'Effects of ATP and amino acid mixtures on progressive muscular dystrophy' SAPPORO IGAKU ZASSHI (1965), 27, 284-97, XP002131218
- D8 BREDT D.S.: 'Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology.' FREE RADICAL RESEARCH, (1999) 31/6 (577-596)., XP002131219
- D9 HAYCOCK J W ET AL: 'Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy.' NEUROREPORT, (1996 DEC 20) 8 (1) 357-61., XP000879014
- D10 CHAO, DANIEL S. ET AL: 'Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy' J. EXP. MED. (1996), 184(2), 609-618, XP000879016
- D11 LAINE, ROMUALD ET AL: 'Neuronal nitric oxide synthase isoforms.alpha. and.mu. are closely related calpain-sensitive proteins' MOL. PHARMACOL. (1998), 54(2), 305-312, XP000879162
- D12 DECRORY, A. ET AL: 'Mini- and full-length dystrophin gene transfer induces the recovery of nitric oxide synthase at the sarcolemma of mdx4cv skeletal muscle fibers' GENE THER. (1998), 5(1), 59-64, XP000879023
- D13 AZZENA G B ET AL: 'Nitric oxide regenerates the normal colonic peristaltic activity in mdx dystrophic mouse.' NEUROSCIENCE LETTERS, (1999 FEB 12) 261 (1-2) 9-12., XP000879028
- D14 THOMAS G.D. ET AL: 'Impaired metabolic modulation of.alpha.-adrenergic vasoconstriction in dystrophin -deficient skeletal muscle.' PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998) 95/25 (15090-15095)., XP002131220
- D15 CHAUBOURT E. ET AL: 'Nitric oxide and L-arginine cause an accumulation of utrophin at the sarcolemma: A possible compensation for dystrophin loss in Duchenne muscular dystrophy.' NEUROBIOLOGY OF DISEASE, (1999) 6/6 (499-507)., XP002131221
- D16 WO 97 25984 A (SCHERING AG ;UNIV TEXAS (US)) 24 juillet 1997 (1997-07-24)
- D17 WAUGH, WILLIAM H. ET AL: 'Evidence that L-arginine is a key amino acid in sickle cell anemia - a preliminary report' NUTR. RES. (N. Y.) (1999), 19(4), 501-518 , XP000972387
- D18 SCHECHTER A.N.: 'NO Therapy.' JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1997) 100/5 (955-956). , XP001028163
- D19 HEAD, C. ALVIN ET AL: 'Low concentrations of nitric oxide increase oxygen affinity

of sickle erythrocytes in vitro and in vivo' J. CLIN. INVEST. (1997), 100(5), 1193-1198 , XP001028165

D20 PERRINE S P ET AL: 'BUTYRATE-INDUCED REACTIVATION OF THE FETAL GLOBIN GENES: A MOLECULAR TREATMENT FOR THE - HEMOGLOBINOPATHIES' EXPERIENTIA, BIRKHAUSER VERLAG. BASEL, CH, vol. 49, no. 2, 15 février 1993 (1993-02-15), pages 133-137, XP000564590 ISSN: 0014-4754

D21 WO 95 28377 A (ABBOTT LAB) 26 octobre 1995 (1995-10-26)

D22 US-A-5 885 621 (HEAD C ALVIN ET AL) 23 mars 1999 (1999-03-23)

D23 PACELLI R. ET AL: 'Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide [6].' LANCET, (1996) 347/9005 (900). , XP001028057

D24 MORRIS, C. ET AL: 'Effects of L-arginine therapy on nitric oxide production in patients with sickle cell disease.' BLOOD, (NOV. 15, 1998) VOL. 92, NO. 10 SUPPL. 1 PART 1-2, PP. 695A. MEETING INFO.: 40TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY MIAMI BEACH, FLORIDA, USA DECEMBER 4-8, 1998 THE AMERICAN SOCIETY OF HEAMATOLOGY. , XP001028060

D25 ENWONWU, C. O.: 'Increased metabolic demand for arginine in sickle cell anemia' MED. SCI. RES. (1989), 17(23), 997-8 , XP001028048

D26 SHER G.D. ET AL: 'Extended therapy with intravenous arginine butyrate in patients with .beta.- hemoglobinopathies.' NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, (1995) 332/24 (1606-1610). , XP001028051

D27 MORRIS, CLAUDIA R. (1) ET AL: 'L-arginine therapy paradoxically decreases nitric oxide production in patients with sickle cell disease.' PEDIATRIC RESEARCH, (APRIL, 1999) VOL. 45, NO. 4 PART 2, PP. 150A. MEETING INFO.: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PEDIATRIC SOCIETY AND THE SOCIETY FOR PEDIATRIC RESEARCH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA MAY 1-4, 1999 , XP001028052

D28 ATZ A M ET AL: 'Inhaled nitric oxide in sickle cell disease with acute chest syndrome.' ANESTHESIOLOGY, (1997 OCT) 87 (4) 988-90. , XP001028046

NOUVEAUTÉ - Art. 33 (1) et (2) PCT

3- Les revendications 1-8 ne sont pas nouvelles au vu des documents de l'art antérieur cités dans le rapport de recherche.

3.1- D1 (p 1 lignes 7-23, p 2 ligne 2 - p 5 ligne 15, p 7 lignes 15-22, p 11 ligne 32 - p 13 ligne 20, p 27 ligne 12 - p 29 ligne 13): NO pour le traitement de dystrophies musculaires (Duchenne, Becker), par la restauration d'une molécule fonctionnelle de dystrophine (thérapie génique).

Les revendications 1-5 et 7-8 ne sont donc pas nouvelles.

3.2- D2 (p 1 ligne 28 - p 2 ligne 17, exemple 1, p 4 lignes 19-29): L-arginine pour le traitement de dystrophies musculaires.

Les revendications 1-5 et 7-8 ne sont donc pas nouvelles.

3.3- D3 (exemple 4, p 3 § 2, revendications 10 et 30-32, p 5 § 2, p 9 § 3 - p 10 § 1, p 14 § 3 - p 15 § 1): composés exogènes donneurs de NO (de même que NO) diminuent la contraction musculaire; inhibiteurs (analogues de l'arginine) de la NOS pour le traitement de dystrophies musculaires.

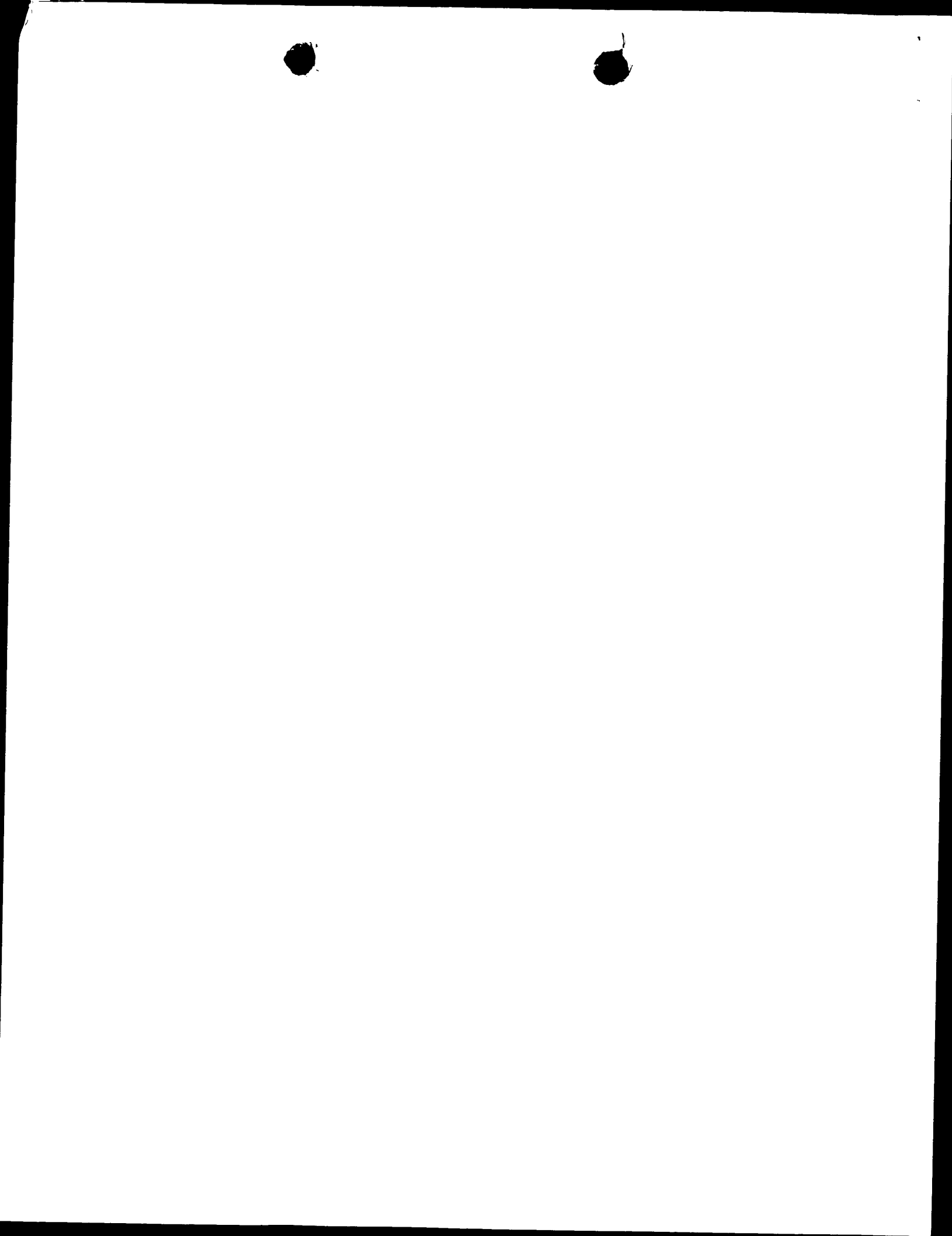
Les revendications 1-5 et 7-8 ne sont donc pas nouvelles.

3.4- D4 (p 27 ligne 34 - p 43 ligne 8): amidines (composés capables de libérer NO) pour traiter des maladies (e. g. génétiques) susceptibles d'être traitées par NO.

Les revendications 1-3 et 8 ne sont donc pas nouvelles.

3.5- D5 (p 1 lignes 16-29, p 42 ligne 34 - p 43 ligne 8): diazeniumdiolates (composés capables de libérer NO) pour traiter des maladies (e. g. génétiques) susceptibles d'être traitées par NO.

Les revendications 1-3 et 8 ne sont donc pas nouvelles.



- 3.6- D6 (p 14 lignes 1-15): inhibiteurs de la NOS (e. g. L-arginine et analogues) pour le traitement et / ou la prévention de maladies induites par la NOS comme par exemple la dystrophie musculaire.

Les revendications 1-3, 5 et 7-8 ne sont donc pas nouvelles.

- 3.7- D7 (abrégé): arginine pour le traitement de la dystrophie musculaire.

Les revendications 1-5 et 7-8 ne sont donc pas nouvelles.

- 3.8- D9 (abrégé, p 357 c 2 § 2 - p 358 c 1 § 2, p 361 c 1 § 2 - p 362 c 2 § 2): NO et donneurs de NO (e. g. L-arginine) ont un rôle protecteur contre les effets des radicaux libres qui contribuent à la dystrophie musculaire de Duchenne.

Les revendications 1-5 et 7-8 ne sont donc pas nouvelles.

- 3.9- D13 (abrégé, p 9 c 1 § 1 - p 12 c 1 § 1): L-arginine régénère le patron moteur dans la souris dystrophique mdx (modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne), ce qui indique que les anomalies des souris mdx sont dues à des changements endogènes de NO (absence de dystrophine).

Les revendications 1-5 et 7-8 ne sont donc pas nouvelles.

- 3.10- D14 (abrégé, p 15091 c 1 § 3, p 15091 c 2 § 2 - p 15092 c 2 § 1, figure 1, p 15094 c 1 § 2 - c 2 § 1, p 15095 c 1 § 3-4): souris dystrophique mdx (modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne); rôle de NO, et de NOS.

Les revendications 1-3, 5 et 7-8 ne sont donc pas nouvelles.

- 3.11- D16: substrats de NOS (e. g. L-arginine), donneurs de NOS pour le traitement et la prévention de l'incontinence urinaire.

Les revendications 1-3 et 8 ne sont donc pas nouvelles.

RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE

Demande internationale n° PCT/FR00/01612

3.12- D17: L-arginine pour le traitement de l'anémie falciforme (drépanocytose).

Les revendications 1-4 et 6-8 ne sont donc pas nouvelles.

3.13- D18: NO et composés donneurs de NO comme la L-arginine pour le traitement de l'anémie falciforme (drépanocytose).

Les revendications 1-4 et 6-8 ne sont donc pas nouvelles.

3.14- D19 (abrégé): NO pour le traitement de l'anémie falciforme (drépanocytose).

Les revendications 1-3 et 6-8 ne sont donc pas nouvelles.

3.15- D20 (abrégé): acide butyrique et dérivés butyriques (arginine butyrate) pour induire la production d'hémoglobine foetale (traitement de la thalassémie)

Les revendications 1-3 et 6-8 ne sont donc pas nouvelles.

3.16- D21 (p 6 ligne 20 - p 7 ligne 2): régulateurs de la NOS pour le traitement de e. g. l'anémie falciforme (drépanocytose).

Les revendications 1-3 et 6-8 ne sont donc pas nouvelles.

3.17- D22 (c 2 ligne 35 - c 6 ligne 40, revendications 1-52): NO ou composés libérateurs de NO pour le traitement d'hémoglobinopathies (dont e. g. la thalassémie).

Les revendications 1-3 et 6-8 ne sont donc pas nouvelles.

3.18- D23 (abrégé): hydroxyurée pour le traitement de l'anémie falciforme (drépanocytose)).

Les revendications 1-3 et 6-8 ne sont donc pas nouvelles.

- 3.19- D24 (abrégé): L-arginine / NO pour le traitement de l'anémie falciforme (drépanocytose).

Les revendications 1-4 et 6-8 ne sont donc pas nouvelles.

- 3.20- D25: anémie falciforme (drépanocytose) caractérisée par une déficience en L-arginine.

- 3.21- D26 (abrégé): injection intraveineuse d'arginine (arginine butyrate) pour le traitement de la thalassémie et la drépanocytose.

Les revendications 1-3 et 6-8 ne sont donc pas nouvelles.

- 3.22- D27 (abrégé): administration de L-arginine à des sujets atteints de drépanocytose.

Les revendications 1-4 et 6-8 ne sont donc pas nouvelles.

- 3.23- D28: effet bénéfique du NO sur des patients atteints de drépanocytose.

Les revendications 1-3 et 6-8 ne sont donc pas nouvelles.

ACTIVITÉ INVENTIVE - Art. 33 (1) et (3) PCT

- 4- Les revendications 1-8 qui ne sont pas nouvelles, ne peuvent pas être considérées comme présentant une activité inventive.**

- 4.1- L'utilisation de NO ou de L-arginine ou d'autres donneurs de NO ou de composés capables de libérer du NO pour le traitement des maladies spécifiées dans la revendication 7 de la présente demande sont connues et / ou anticipées dans les documents cités dans le rapport de recherche.



10/009198

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 décembre 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/76451 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

A61K 31/04, 31/195, 31/535,
33/26, 33/24, 31/26, A61P 7/06, 21/00

(FR). **LEPRINCE, Christiane** [FR/FR]: 44, allée de la
Mare l'Oiseau, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR00/01612

(74) Mandataires : **BREESE, Pierre** etc.; Breesse-Majerow-
icz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 9 juin 2000 (09.06.2000)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(30) Données relatives à la priorité :

99/07442 11 juin 1999 (11.06.1999) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794
Paris Cedex 16 (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **ISRAEL, Maurice** [FR/FR]; 2, rue Aristide Briand, F-91440 Bu-
res-sur-Yvette (FR). **DE LA PORTE, Sabine** [FR/FR]; 86,
rue Royale, F-78000 Versailles (FR). **FOSSIER, Philippe**
[FR/FR]; 11, rue Victor Baron, F-95380 Louvres (FR).
CHAUBOURT, Emmanuel [FR/FR]; 18, route de Mon-
tignac, F-16330 Vars (FR). **BAUX, Gérard** [FR/FR]; 7, av-
enue des Bois Clairs, F-91700 Sainte Geneviève des Bois

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 20 juin 2002

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

RECEIVED

OCT 07 2002

TECH CENTER 1600/2900

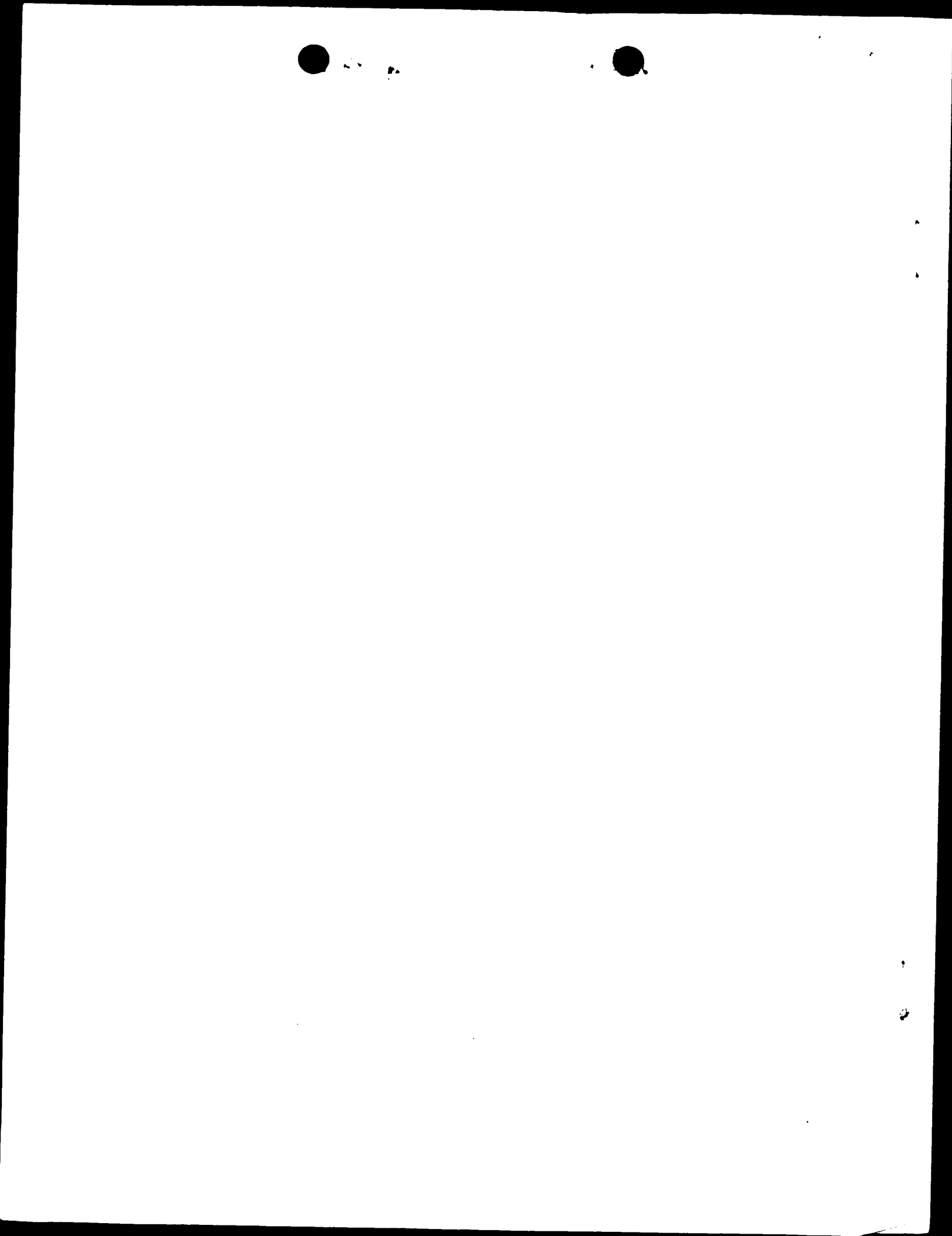
(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING NO OR AT LEAST A NO DONOR COMPOUND INDUCING
NO FORMATION IN CELLS

(54) Titre : COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT DU NO UN COMPOSÉ DONNEUR DE NO, OU INDUC-
TEUR DE LA FORMATION DE NO ET SON UTILISATION EN THÉRAPIE

(57) Abstract: The invention concerns the use of NO, a NO donor compound or a compound capable of releasing, stimulating or
inducing NO formation in cells to prepare a medicine for treating or preventing a disease resulting from deficiency of an adult gene
in a person for the re-expression of said homologous foetal gene. The invention particularly concerns the treatment of Duchenne or
Becker muscular dystrophy, or thalassemia or sickle cell disease, in particular using arginin.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation de NO, d'un composé donneur de NO ou d'un composé capable de li-
béraliser, de favoriser ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou
à la prévention d'une maladie résultant de la déficience d'un gène adulte chez un individu par la ré-expression dudit gène foetale
homologue. La présente invention concerne tout particulièrement le traitement des dystrophies musculaires, comme la dystrophie
musculaire de Duchenne ou de Becker, ou la thalassémie ou la drépanocytose notamment par l'arginine.

WO 00/76451 A3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 00/01612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/04 A61K31/195 A61K31/535 A61K33/26 A61K33/24
A61K31/26 A61P7/06 A61P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 33173 A (UNIV CALIFORNIA) 12 September 1997 (1997-09-12) abstract page 1, line 7-23 page 2, line 2 -page 5, line 15 page 7, line 15-22 page 11, line 32 -page 13, line 20 page 27, line 12 -page 29, line 13	1-4, 6-8
X	DE 297 09 820 U (NUTREND S R O) 31 July 1997 (1997-07-31) page 1, line 28 -page 2, line 17; example 1 page 4, line 19-29	1-4, 6-8



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 September 2001

Date of mailing of the international search report

10/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

A. Jakobs

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/FR 00/01612

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 02241 A (UNIV DUKE ;HARVARD COLLEGE (US)) 1 February 1996 (1996-02-01) abstract; example 4 page 3, paragraph 2; claims 10,30-32 page 5, paragraph 2 page 9, paragraph 3 -page 10, paragraph 1 page 14, paragraph 3 -page 15, paragraph 1 ---	1-8
X	WO 99 01427 A (HRABIE JOSEPH A ;KEEFER LARRY K (US); GOVERNMENT OF THE UNITED STA) 14 January 1999 (1999-01-14) abstract page 27, line 30 -page 28, line 7 ---	1-3,8
X	WO 98 13358 A (BOGDAN CHRISTIAN ;SAAVEDRA JOSEPH E (US); JI XINHUA (US); US GOVER) 2 April 1998 (1998-04-02) page 1, line 16-29 page 42, line 34 -page 43, line 8 ---	1-3,8
X	EP 0 870 763 A (ONO PHARMACEUTICAL CO) 14 October 1998 (1998-10-14) abstract page 14, line 1-15 ---	1-3
X	YAMADA, SHUICHI: "Effects of ATP and amino acid mixtures on progressive muscular dystrophy" SAPPORO IGAKU ZASSHI (1965), 27, 284-97, XP002131218 abstract ---	1-4,6-8
X,P	BREDT D.S.: "Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology." FREE RADICAL RESEARCH, (1999) 31/6 (577-596)., XP002131219 page 586, column 2, paragraph 2 -page 587, column 2, paragraph 1 ---	1-3,6-8
X	HAYCOCK J W ET AL: "Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy." NEUROREPORT, (1996 DEC 20) 8 (1) 357-61., XP000879014 abstract page 357, column 2, paragraph 2 -page 358, column 1, paragraph 2 page 361, column 1, paragraph 2 -page 362, column 2, paragraph 2 ---	1-3,6-8

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01612

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHAO, DANIEL S. ET AL: "Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy" J. EXP. MED. (1996), 184(2), 609-618, XP000879016 the whole document	1-8
A	LAINÉ, ROMUALD ET AL: "Neuronal nitric oxide synthase isoforms.alpha. and.mu. are closely related calpain-sensitive proteins" MOL. PHARMACOL. (1998), 54(2), 305-312, XP000879162 abstract	1-8
A	DECORRY, A. ET AL: "Mini- and full-length dystrophin gene transfer induces the recovery of nitric oxide synthase at the sarcolemma of mdx4cv skeletal muscle fibers" GENE THER. (1998), 5(1), 59-64, XP000879023 the whole document	1-8
X	AZZENA G B ET AL: "Nitric oxide regenerates the normal colonic peristaltic activity in mdx dystrophic mouse." NEUROSCIENCE LETTERS, (1999 FEB 12) 261 (1-2) 9-12., XP000879028 abstract page 9, column 1, paragraph 1 -page 12, column 1, paragraph 1	1-4,6-8
X	THOMAS G.D. ET AL: "Impaired metabolic modulation of.alpha.-adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998) 95/25 (15090-15095)., XP002131220 abstract page 15091, column 1, paragraph 3 page 15091, column 2, paragraph 2 -page 15092, column 2, paragraph 1; figure 1 page 15094, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 1 page 15095, column 1, paragraphs 3,4 -/--	1-3,5-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 00/01612

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	CHAUBOURT E. ET AL: "Nitric oxide and L-arginine cause an accumulation of utrophin at the sarcolemma: A possible compensation for dystrophin loss in Duchenne muscular dystrophy." NEUROBIOLOGY OF DISEASE, (1999) 6/6 (499-507)., XP002131221 abstract	1-8
X	WO 97 25984 A (SCHERING AG ;UNIV TEXAS (US)) 24 July 1997 (1997-07-24) the whole document	8
X	WAUGH, WILLIAM H. ET AL: "Evidence that L-arginine is a key amino acid in sickle cell anemia - a preliminary report" NUTR. RES. (N. Y.) (1999), 19(4), 501-518 XP000972387 the whole document	1-8
X	SCHECHTER A.N.: "NO Therapy." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1997) 100/5 (955-956)., XP001028163 the whole document	1-8
X	HEAD, C. ALVIN ET AL: "Low concentrations of nitric oxide increase oxygen affinity of sickle erythrocytes in vitro and in vivo" J. CLIN. INVEST. (1997), 100(5), 1193-1198 , XP001028165 abstract	1-8
X	PERRINE S P ET AL: "BUTYRATE-INDUCED REACTIVATION OF THE FETAL GLOBIN GENES: A MOLECULAR TREATMENT FOR THE -HEMOGLOBINOPATHIES" EXPERIENTIA, BIRKHAUSER VERLAG. BASEL, CH, vol. 49, no. 2, 15 February 1993 (1993-02-15), pages 133-137, XP000564590 ISSN: 0014-4754 abstract	1-8
X	WO 95 28377 A (ABBOTT LAB) 26 October 1995 (1995-10-26) abstract page 6, line 20 -page 7, line 2	1-8

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01612

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 885 621 A (HEAD C ALVIN ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23) abstract column 2, line 35 -column 6, line 40; claims 1-52 ---	1-8
X	PACELLI R. ET AL: "Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide '6!.' LANCET, (1996) 347/9005 (900). , XP001028057 abstract ---	1-8
X	MORRIS, C. ET AL: "Effects of L-arginine therapy on nitric oxide production in patients with sickle cell disease." BLOOD, (NOV. 15, 1998) VOL. 92, NO. 10 SUPPL. 1 PART 1-2, PP. 695A. MEETING INFO.: 40TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY MIAMI BEACH, FLORIDA, USA DECEMBER 4-8, 1998 THE AMERICAN SOCIETY OF HEAMATOLOGY. , XP001028060 abstract ---	1-8
X	ENWONWU, C. O.: "Increased metabolic demand for arginine in sickle cell anemia" MED. SCI. RES. (1989), 17(23), 997-8 , XP001028048 the whole document ---	1-8
X	SHER G.D. ET AL: "Extended therapy with intravenous arginine butyrate in patients with beta.- hemoglobinopathies." NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, (1995) 332/24 (1606-1610). , XP001028051 abstract ---	1-8
X	MORRIS, CLAUDIA R. (1) ET AL: "L-arginine therapy paradoxically decreases nitric oxide production in patients with sickle cell disease." PEDIATRIC RESEARCH, (APRIL, 1999) VOL. 45, NO. 4 PART 2, PP. 150A. MEETING INFO.: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PEDIATRIC SOCIETY AND THE SOCIETY FOR PEDIATRIC RESEARCH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA MAY 1-4, 1999 , XP001028052 abstract --- -/--	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 00/01612

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ATZ A M ET AL: "Inhaled nitric oxide in sickle cell disease with acute chest syndrome." ANESTHESIOLOGY, (1997 OCT) 87 (4) 988-90.</p> <p>XP001028046 the whole document</p>	1-8

Follow-up of Box I.2

Claims 1-8 of the present application concerne a use/composition defined (inter alia) by means of the following parameters:

P1: a compound capable of releasing or of inducing the release of NO.

The use of said parameters is considered, in the present context, as resulting in a lack of clarity. It is not possible to compare the parameters which the applicant has chosen to use with what is disclosed in prior art. The resulting lack of clarity is such that it is not possible to carry out any exhaustive meaningful search. Consequently, the search was limited to the compounds specifically mentioned in the claims.

Moreover, it is not clear which diseases must be understood by the definition "disease resulting from deficiency of the adult gene in an individual having a foetal gene homologous with said adult gene". Consequently, the search was limited to diseases specified in the claims, that is Duchenne and Becker muscular dystrophy, thalassemia or sickle cell disease.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or any under any Chapter II procedure

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01612

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9733173	A	12-09-1997	AU 2208097 A WO 9733173 A1	22-09-1997 12-09-1997
DE 29709820	U	31-07-1997	DE 29709820 U1 PL 320472 A1	31-07-1997 22-12-1997
WO 9602241	A	01-02-1996	US 5583101 A AU 3008395 A CA 2194991 A1 JP 10511075 T WO 9602241 A1 US 5545614 A	10-12-1996 16-02-1996 01-02-1996 27-10-1998 01-02-1996 13-08-1996
WO 9901427	A	14-01-1999	AU 726861 B2 AU 8281598 A EP 1000023 A2 WO 9901427 A2 US 6232336 B1	23-11-2000 25-01-1999 17-05-2000 14-01-1999 15-05-2001
WO 9813358	A	02-04-1998	AU 733590 B2 AU 4595797 A EP 0929538 A1 WO 9813358 A1	17-05-2001 17-04-1998 21-07-1999 02-04-1998
EP 0870763	A	14-10-1998	AU 6077798 A CA 2234571 A1 CN 1202486 A EP 0870763 A1 HU 9800865 A2 JP 3060214 B2 JP 11171866 A NO 981658 A TW 427979 B US 6110930 A US 6228866 B1 ZA 9803009 A	15-10-1998 10-10-1998 23-12-1998 14-10-1998 28-01-1999 10-07-2000 29-06-1999 12-10-1998 01-04-2001 29-08-2000 08-05-2001 22-10-1998
WO 9725984	A	24-07-1997	US 5789442 A AU 721998 B2 AU 1703197 A BR 9707026 A CN 1208346 A CZ 9802243 A3 EP 0874627 A1 JP 11512748 T NO 983288 A PL 327823 A1 SK 91798 A3 WO 9725984 A1 US 6028106 A ZA 9700458 A	04-08-1998 20-07-2000 11-08-1997 20-07-1999 17-02-1999 17-03-1999 04-11-1998 02-11-1999 17-09-1998 04-01-1999 10-12-1999 24-07-1997 22-02-2000 14-07-1998
WO 9528377	A	26-10-1995	WO 9528377 A1	26-10-1995
US 5885621	A	23-03-1999	AU 720686 B2 AU 2440397 A BR 9708601 A CA 2251530 A1	08-06-2000 29-10-1997 03-08-1999 16-10-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01612

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5885621	A	CN 1227485 A	01-09-1999
		EP 0914103 A1	12-05-1999
		JP 2000510448 T	15-08-2000
		WO 9737644 A1	16-10-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. Internationale No

PCT/FR 00/01612

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K31/04 A61K31/195 A61K31/535 A61K33/26 A61K33/24
A61K31/26 A61P7/06 A61P21/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97 33173 A (UNIV CALIFORNIA) 12 septembre 1997 (1997-09-12) abrégé page 1, ligne 7-23 page 2, ligne 2 -page 5, ligne 15 page 7, ligne 15-22 page 11, ligne 32 -page 13, ligne 20 page 27, ligne 12 -page 29, ligne 13 ---	1-4,6-8
X	DE 297 09 820 U (NUTREND S R O) 31 juillet 1997 (1997-07-31) page 1, ligne 28 -page 2, ligne 17; exemple 1 page 4, ligne 19-29 --- -/--	1-4,6-8



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

G document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 septembre 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/10/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

A. Jakobs

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. Je Internationale No

PCT/FR 00/01612

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 02241 A (UNIV DUKE ;HARVARD COLLEGE (US)) 1 février 1996 (1996-02-01) abrégé; exemple 4 page 3, alinéa 2; revendications 10,30-32 page 5, alinéa 2 page 9, alinéa 3 -page 10, alinéa 1 page 14, alinéa 3 -page 15, alinéa 1 ---	1-8
X	WO 99 01427 A (HRABIE JOSEPH A ;KEEFER LARRY K (US); GOVERNMENT OF THE UNITED STA) 14 janvier 1999 (1999-01-14) abrégé page 27, ligne 30 -page 28, ligne 7 ---	1-3,8
X	WO 98 13358 A (BOGDAN CHRISTIAN ;SAAVEDRA JOSEPH E (US); JI XINHUA (US); US GOVER) 2 avril 1998 (1998-04-02) page 1, ligne 16-29 page 42, ligne 34 -page 43, ligne 8 ---	1-3,8
X	EP 0 870 763 A (ONO PHARMACEUTICAL CO) 14 octobre 1998 (1998-10-14) abrégé page 14, ligne 1-15 ---	1-3
X	YAMADA, SHUICHI: "Effects of ATP and amino acid mixtures on progressive muscular dystrophy" SAPPORO IGAKU ZASSHI (1965), 27, 284-97, XP002131218 abrégé ---	1-4,6-8
X,P	BREDT D.S.: "Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology." FREE RADICAL RESEARCH, (1999) 31/6 (577-596)., XP002131219 page 586, colonne 2, alinéa 2 -page 587, colonne 2, alinéa 1 ---	1-3,6-8
X	HAYCOCK J W ET AL: "Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy." NEUROREPORT, (1996 DEC 20) 8 (1) 357-61., XP000879014 abrégé page 357, colonne 2, alinéa 2 -page 358, colonne 1, alinéa 2 page 361, colonne 1, alinéa 2 -page 362, colonne 2, alinéa 2 ---	1-3,6-8
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. Je Internationale No

PCT/FR 00/01612

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CHAO, DANIEL S. ET AL: "Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy"</p> <p>J. EXP. MED. (1996), 184(2), 609-618,</p> <p>XP000879016</p> <p>le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-8
A	<p>LAINE, ROMUALD ET AL: "Neuronal nitric oxide synthase isoforms.alpha. and.mu. are closely related calpain-sensitive proteins"</p> <p>MOL. PHARMACOL. (1998), 54(2), 305-312,</p> <p>XP000879162</p> <p>abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-8
A	<p>DECORRY, A. ET AL: "Mini- and full-length dystrophin gene transfer induces the recovery of nitric oxide synthase at the sarcolemma of mdx4cv skeletal muscle fibers"</p> <p>GENE THER. (1998), 5(1), 59-64,</p> <p>XP000879023</p> <p>le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-8
X	<p>AZZENA G B ET AL: "Nitric oxide regenerates the normal colonic peristaltic activity in mdx dystrophic mouse."</p> <p>NEUROSCIENCE LETTERS, (1999 FEB 12) 261 (1-2) 9-12.,</p> <p>XP000879028</p> <p>abrégé</p> <p>page 9, colonne 1, alinéa 1 -page 12, colonne 1, alinéa 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,6-8
X	<p>THOMAS G.D. ET AL: "Impaired metabolic modulation of.alpha.-adrenergic vasoconstriction in dystrophin -deficient skeletal muscle."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998) 95/25 (15090-15095).,</p> <p>XP002131220</p> <p>abrégé</p> <p>page 15091, colonne 1, alinéa 3</p> <p>page 15091, colonne 2, alinéa 2 -page 15092, colonne 2, alinéa 1; figure 1</p> <p>page 15094, colonne 1, alinéa 2 -colonne 2, alinéa 1</p> <p>page 15095, colonne 1, alinéas 3,4</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-3,5-8

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. le Internationale No

PCT/FR 00/01612

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	CHAUBOURT E. ET AL: "Nitric oxide and L-arginine cause an accumulation of utrophin at the sarcolemma: A possible compensation for dystrophin loss in Duchenne muscular dystrophy." NEUROBIOLOGY OF DISEASE, (1999) 6/6 (499-507). XP002131221 abrégé	1-8
X	WO 97 25984 A (SCHERING AG ;UNIV TEXAS (US)) 24 juillet 1997 (1997-07-24) le document en entier	8
X	WAUGH, WILLIAM H. ET AL: "Evidence that L-arginine is a key amino acid in sickle cell anemia - a preliminary report" NUTR. RES. (N. Y.) (1999), 19(4), 501-518 XP000972387 le document en entier	1-8
X	SCHECHTER A.N.: "NO Therapy." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1997) 100/5 (955-956). XP001028163 le document en entier	1-8
X	HEAD, C. ALVIN ET AL: "Low concentrations of nitric oxide increase oxygen affinity of sickle erythrocytes in vitro and in vivo" J. CLIN. INVEST. (1997), 100(5), 1193-1198 XP001028165 abrégé	1-8
X	PERRINE S P ET AL: "BUTYRATE-INDUCED REACTIVATION OF THE FETAL GLOBIN GENES: A MOLECULAR TREATMENT FOR THE -HEMOGLOBINOPATHIES" EXPERIENTIA, BIRKHAUSER VERLAG. BASEL, CH, vol. 49, no. 2, 15 février 1993 (1993-02-15), pages 133-137, XP000564590 ISSN: 0014-4754 abrégé	1-8
X	WO 95 28377 A (ABBOTT LAB) 26 octobre 1995 (1995-10-26) abrégé page 6, ligne 20 -page 7, ligne 2	1-8

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. Internationale No

PCT/FR 00/01612

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 885 621 A (HEAD C ALVIN ET AL) 23 mars 1999 (1999-03-23) abrégé colonne 2, ligne 35 -colonne 6, ligne 40; revendications 1-52 ---	1-8
X	PACELLI R. ET AL: "Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide '6!'" LANCET, (1996) 347/9005 (900). , XP001028057 abrégé ---	1-8
X	MORRIS, C. ET AL: "Effects of L-arginine therapy on nitric oxide production in patients with sickle cell disease." BLOOD, (NOV. 15, 1998) VOL. 92, NO. 10 SUPPL. 1 PART 1-2, PP. 695A. MEETING INFO.: 40TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY MIAMI BEACH, FLORIDA, USA DECEMBER 4-8, 1998 THE AMERICAN SOCIETY OF HEAMATOLOGY. , XP001028060 abrégé ---	1-8
X	ENWONWU, C. O.: "Increased metabolic demand for arginine in sickle cell anemia" MED. SCI. RES. (1989), 17(23), 997-8 , XP001028048 le document en entier ---	1-8
X	SHER G.D. ET AL: "Extended therapy with intravenous arginine butyrate in patients with beta.- hemoglobinopathies." NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, (1995) 332/24 (1606-1610). , XP001028051 abrégé ---	1-8
X	MORRIS, CLAUDIA R. (1) ET AL: "L-arginine therapy paradoxically decreases nitric oxide production in patients with sickle cell disease." PEDIATRIC RESEARCH, (APRIL, 1999) VOL. 45, NO. 4 PART 2, PP. 150A. MEETING INFO.: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PEDIATRIC SOCIETY AND THE SOCIETY FOR PEDIATRIC RESEARCH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA MAY 1-4, 1999 , XP001028052 abrégé ---	1-8

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. Je Internationale No

PCT/FR 00/01612

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ATZ A M ET AL: "Inhaled nitric oxide in sickle cell disease with acute chest syndrome."</p> <p>ANESTHESIOLOGY, (1997 OCT) 87 (4) 988-90.</p> <p>XP001028046</p> <p>le document en entier</p>	1-8

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les revendications 1-8 présentes ont trait à une utilisation/composition défini (entre autres)

au moyen des paramètres suivants:

P1: un composé capable de libérer ou d'induire la libération de NO.

L'utilisation de ces paramètres est considérée, dans le présent contexte, comme menant à un manque de clarté. Il est impossible de comparer les paramètres que le déposant a choisi d'utiliser avec ce qui est révélé dans l'état de la technique. Le manque de clarté qui en découle est tel qu'une recherche significative complète est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux composés spécifiquement mentionnés dans les revendications.

De plus, il n'est pas clair quelles maladies il faut entendre par la définition "maladie résultant de la déficience d'un gène adulte chez un individu possédant un gène foetal homologue audit gène adulte". Par conséquent, la recherche a été limitée aux affections spécifiées dans les revendications c'est à dire la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker, la thalassémie et la drépanocytose.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE F ^{CH}ERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De. Je Internationale No

PCT/FR 00/01612

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9733173	A	12-09-1997	AU 2208097 A	22-09-1997
			WO 9733173 A1	12-09-1997
DE 29709820	U	31-07-1997	DE 29709820 U1	31-07-1997
			PL 320472 A1	22-12-1997
WO 9602241	A	01-02-1996	US 5583101 A	10-12-1996
			AU 3008395 A	16-02-1996
			CA 2194991 A1	01-02-1996
			JP 10511075 T	27-10-1998
			WO 9602241 A1	01-02-1996
			US 5545614 A	13-08-1996
WO 9901427	A	14-01-1999	AU 726861 B2	23-11-2000
			AU 8281598 A	25-01-1999
			EP 1000023 A2	17-05-2000
			WO 9901427 A2	14-01-1999
			US 6232336 B1	15-05-2001
WO 9813358	A	02-04-1998	AU 733590 B2	17-05-2001
			AU 4595797 A	17-04-1998
			EP 0929538 A1	21-07-1999
			WO 9813358 A1	02-04-1998
EP 0870763	A	14-10-1998	AU 6077798 A	15-10-1998
			CA 2234571 A1	10-10-1998
			CN 1202486 A	23-12-1998
			EP 0870763 A1	14-10-1998
			HU 9800865 A2	28-01-1999
			JP 3060214 B2	10-07-2000
			JP 11171866 A	29-06-1999
			NO 981658 A	12-10-1998
			TW 427979 B	01-04-2001
			US 6110930 A	29-08-2000
			US 6228866 B1	08-05-2001
			ZA 9803009 A	22-10-1998
WO 9725984	A	24-07-1997	US 5789442 A	04-08-1998
			AU 721998 B2	20-07-2000
			AU 1703197 A	11-08-1997
			BR 9707026 A	20-07-1999
			CN 1208346 A	17-02-1999
			CZ 9802243 A3	17-03-1999
			EP 0874627 A1	04-11-1998
			JP 11512748 T	02-11-1999
			NO 983288 A	17-09-1998
			PL 327823 A1	04-01-1999
			SK 91798 A3	10-12-1999
			WO 9725984 A1	24-07-1997
			US 6028106 A	22-02-2000
			ZA 9700458 A	14-07-1998
WO 9528377	A	26-10-1995	WO 9528377 A1	26-10-1995
US 5885621	A	23-03-1999	AU 720686 B2	08-06-2000
			AU 2440397 A	29-10-1997
			BR 9708601 A	03-08-1999
			CA 2251530 A1	16-10-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den. de l'invention internationale No

PCT/FR 00/01612

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5885621	A	CN 1227485 A	01-09-1999
		EP 0914103 A1	12-05-1999
		JP 2000510448 T	15-08-2000
		WO 9737644 A1	16-10-1997

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

WO 00/76451
PCT/FR00/01612

PCT

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

BREESE, Pierre
Breesse-Majerowicz
3, avenue de l'Opéra
F-75001 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 21 décembre 2000 (21.12.00)		AVIS IMPORTANT
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 4894PCT		
Demande internationale no PCT/FR00/01612	Date du dépôt international (jour/mois/année) 09 juin 2000 (09.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 11 juin 1999 (11.06.99)
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS etc		

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:

AG,AU,DZ,KP,KR,MZ,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:

AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,
GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,
NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le

21 décembre 2000 (21.12.00) sous le numéro WO 00/76451

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la **demande d'examen préliminaire international** doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé J. Zahra
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38



TRAITE DE OPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 21 février 2001 (21.02.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/01612	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 4894PCT
Date du dépôt international (jour/mois/année) 09 juin 2000 (09.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 11 juin 1999 (11.06.99)
Déposant ISRAEL, Maurice etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

27 décembre 2000 (27.12.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

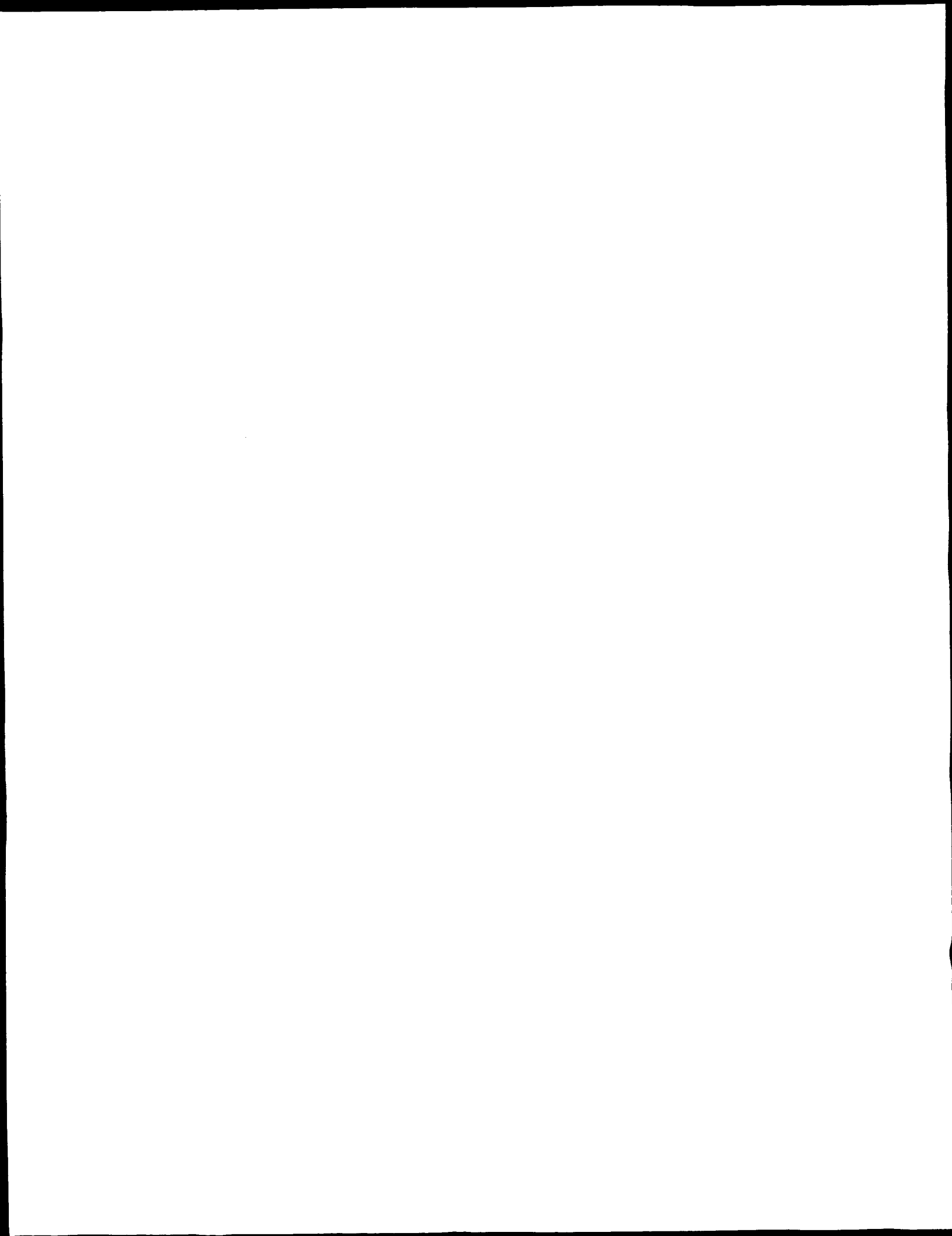
Bureau international de l'OMPI
 34, chemin des Colombettes
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Antonia Muller

no de téléphone: (41-22) 338.83.38



09/1009/98

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 4894PCT	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après
Demande internationale n° PCT/FR 00/01612	Date du dépôt international (jour/mois/année) 09/06/2000
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 11/06/1999

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 8 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐

la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale (le cas échéant).

- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale dans la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐

contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐

déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐

remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐

La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐

La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

☐

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☐

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☒

Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT DU NO UN COMPOSE DONNEUR DE NO, OU
INDUCTEUR DE LA FORMATION DE NO ET SON UTILISATION EN THERAPIE

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☐

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☒

le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐

suggérée par le déposant.

☐

parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐

parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒

Aucune des figures n'est à publier.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les revendications 1-8 présentes ont trait à une utilisation/composition défini (entre autres)

au moyen des paramètres suivants:

P1: un composé capable de libérer ou d'induire la libération de NO.

L'utilisation de ces paramètres est considérée, dans le présent contexte, comme menant à un manque de clarté. Il est impossible de comparer les paramètres que le déposant a choisi d'utiliser avec ce qui est révélé dans l'état de la technique. Le manque de clarté qui en découle est tel qu'une recherche significative complète est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux composés spécifiquement mentionnés dans les revendications.

De plus, il n'est pas clair quelles maladies il faut endendre par la définition "maladie résultant de la déficience d'un gène adulte chez un individu possédant un gène foetal homologue audit gène adulte". Par conséquent, la recherche a été limitée aux affections spécifiées dans les revendications c'est à dire la dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker, la thalassémie et la drépanocytose.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.



Cadre III TEXTE DE L'ABREGE (suite du point 5 de la première feuille)

La présente invention concerne l'utilisation de NO, d'un composé donneur de NO ou d'un composé capable de libérer, de favoriser ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une maladie résultant de la déficience d'un gène adulte chez un individu par la ré-expression dudit gène fœtale homologue. La présente invention concerne tout particulièrement le traitement des dystrophies musculaires, comme la dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker, ou la thalassémie ou la drépanocytose, notamment par l'arginine



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01612

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K31/04 A61K31/195 A61K31/535 A61K33/26 A61K33/24
 A61K31/26 A61P7/06 A61P21/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97 33173 A (UNIV CALIFORNIA) 12 septembre 1997 (1997-09-12) abrégé page 1, ligne 7-23 page 2, ligne 2 -page 5, ligne 15 page 7, ligne 15-22 page 11, ligne 32 -page 13, ligne 20 page 27, ligne 12 -page 29, ligne 13 ---	1-4, 6-8
X	DE 297 09 820 U (NUTREND S R O) 31 juillet 1997 (1997-07-31) page 1, ligne 28 -page 2, ligne 17; exemple 1 page 4, ligne 19-29 --- -/--	1-4, 6-8



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 septembre 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/10/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

A. Jakobs



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01612

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WO 96 02241 A (UNIV DUKE ; HARVARD COLLEGE (US)) 1 février 1996 (1996-02-01) abrégé; exemple 4 page 3, alinéa 2; revendications 10,30-32 page 5, alinéa 2 page 9, alinéa 3 -page 10, alinéa 1 page 14, alinéa 3 -page 15, alinéa 1 ---</p>	1-8
X	<p>WO 99 01427 A (HRABIE JOSEPH A ; KEEFER LARRY K (US); GOVERNMENT OF THE UNITED STA) 14 janvier 1999 (1999-01-14) abrégé page 27, ligne 30 -page 28, ligne 7 ---</p>	1-3,8
X	<p>WO 98 13358 A (BOGDAN CHRISTIAN ; SAAVEDRA JOSEPH E (US); JI XINHUA (US); US GOVER) 2 avril 1998 (1998-04-02) page 1, ligne 16-29 page 42, ligne 34 -page 43, ligne 8 ---</p>	1-3,8
X	<p>EP 0 870 763 A (ONO PHARMACEUTICAL CO) 14 octobre 1998 (1998-10-14) abrégé page 14, ligne 1-15 ---</p>	1-3
X	<p>YAMADA, SHUICHI: "Effects of ATP and amino acid mixtures on progressive muscular dystrophy" SAPPORO IGAKU ZASSHI (1965), 27, 284-97, XP002131218 abrégé ---</p>	1-4,6-8
X,P	<p>BREDT D.S.: "Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology." FREE RADICAL RESEARCH, (1999) 31/6 (577-596)., XP002131219 page 586, colonne 2, alinéa 2 -page 587, colonne 2, alinéa 1 ---</p>	1-3,6-8
X	<p>HAYCOCK J W ET AL: "Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy." NEUROREPORT, (1996 DEC 20) 8 (1) 357-61., XP000879014 abrégé page 357, colonne 2, alinéa 2 -page 358, colonne 1, alinéa 2 page 361, colonne 1, alinéa 2 -page 362, colonne 2, alinéa 2 --- -/--</p>	1-3,6-8



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01612

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CHAO, DANIEL S. ET AL: "Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy"</p> <p>J. EXP. MED. (1996), 184(2), 609-618,</p> <p>XP000879016</p> <p>le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-8
A	<p>LAINE, ROMUALD ET AL: "Neuronal nitric oxide synthase isoforms.alpha. and.mu. are closely related calpain-sensitive proteins"</p> <p>MOL. PHARMACOL. (1998), 54(2), 305-312,</p> <p>XP000879162</p> <p>abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-8
A	<p>DECORRY, A. ET AL: "Mini- and full-length dystrophin gene transfer induces the recovery of nitric oxide synthase at the sarcolemma of mdx4cv skeletal muscle fibers"</p> <p>GENE THER. (1998), 5(1), 59-64,</p> <p>XP000879023</p> <p>le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-8
X	<p>AZZENA G B ET AL: "Nitric oxide regenerates the normal colonic peristaltic activity in mdx dystrophic mouse."</p> <p>NEUROSCIENCE LETTERS, (1999 FEB 12) 261 (1-2) 9-12.,</p> <p>XP000879028</p> <p>abrégé</p> <p>page 9, colonne 1, alinéa 1 -page 12, colonne 1, alinéa 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,6-8
X	<p>THOMAS G.D. ET AL: "Impaired metabolic modulation of.alpha.-adrenergic vasoconstriction in dystrophin -deficient skeletal muscle."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1998) 95/25 (15090-15095).,</p> <p>XP002131220</p> <p>abrégé</p> <p>page 15091, colonne 1, alinéa 3</p> <p>page 15091, colonne 2, alinéa 2 -page 15092, colonne 2, alinéa 1; figure 1</p> <p>page 15094, colonne 1, alinéa 2 -colonne 2, alinéa 1</p> <p>page 15095, colonne 1, alinéas 3,4</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-3,5-8



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/ISA/210 00/01612

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	CHAUBOURT E. ET AL: "Nitric oxide and L-arginine cause an accumulation of utrophin at the sarcolemma: A possible compensation for dystrophin loss in Duchenne muscular dystrophy." NEUROBIOLOGY OF DISEASE, (1999) 6/6 (499-507). XP002131221 abrégé	1-8
X	WO 97 25984 A (SCHERING AG ;UNIV TEXAS (US)) 24 juillet 1997 (1997-07-24) le document en entier	8
X	WAUGH, WILLIAM H. ET AL: "Evidence that L-arginine is a key amino acid in sickle cell anemia - a preliminary report" NUTR. RES. (N. Y.) (1999), 19(4), 501-518 XP000972387 le document en entier	1-8
X	SCHECHTER A.N.: "NO Therapy." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, (1997) 100/5 (955-956). XP001028163 le document en entier	1-8
X	HEAD, C. ALVIN ET AL: "Low concentrations of nitric oxide increase oxygen affinity of sickle erythrocytes in vitro and in vivo" J. CLIN. INVEST. (1997), 100(5), 1193-1198 XP001028165 abrégé	1-8
X	PERRINE S P ET AL: "BUTYRATE-INDUCED REACTIVATION OF THE FETAL GLOBIN GENES: A MOLECULAR TREATMENT FOR THE -HEMOGLOBINOPATHIES" EXPERIENTIA, BIRKHAUSER VERLAG. BASEL, CH, vol. 49, no. 2, 15 février 1993 (1993-02-15), pages 133-137, XP000564590 ISSN: 0014-4754 abrégé	1-8
X	WO 95 28377 A (ABBOTT LAB) 26 octobre 1995 (1995-10-26) abrégé page 6, ligne 20 -page 7, ligne 2	1-8

-/--



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/ISA/210 00/01612

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 885 621 A (HEAD C ALVIN ET AL) 23 mars 1999 (1999-03-23) abrégé colonne 2, ligne 35 -colonne 6, ligne 40; revendications 1-52 ---	1-8
X	PACELLI R. ET AL: "Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide '6!." LANCET, (1996) 347/9005 (900). , XP001028057 abrégé ---	1-8
X	MORRIS, C. ET AL: "Effects of L-arginine therapy on nitric oxide production in patients with sickle cell disease." BLOOD, (NOV. 15, 1998) VOL. 92, NO. 10 SUPPL. 1 PART 1-2, PP. 695A. MEETING INFO.: 40TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY MIAMI BEACH, FLORIDA, USA DECEMBER 4-8, 1998 THE AMERICAN SOCIETY OF HEAMATOLOGY. , XP001028060 abrégé ---	1-8
X	ENWONWU, C. O.: "Increased metabolic demand for arginine in sickle cell anemia" MED. SCI. RES. (1989), 17(23), 997-8 , XP001028048 le document en entier ---	1-8
X	SHER G.D. ET AL: "Extended therapy with intravenous arginine butyrate in patients with beta.- hemoglobinopathies." NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, (1995) 332/24 (1606-1610). , XP001028051 abrégé ---	1-8
X	MORRIS, CLAUDIA R. (1) ET AL: "L-arginine therapy paradoxically decreases nitric oxide production in patients with sickle cell disease." PEDIATRIC RESEARCH, (APRIL, 1999) VOL. 45, NO. 4 PART 2, PP. 150A. MEETING INFO.: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PEDIATRIC SOCIETY AND THE SOCIETY FOR PEDIATRIC RESEARCH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA MAY 1-4, 1999 , XP001028052 abrégé --- -/--	1-8



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01612

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ATZ A M ET AL: "Inhaled nitric oxide in sickle cell disease with acute chest syndrome."</p> <p>ANESTHESIOLOGY, (1997 OCT) 87 (4) 988-90.</p> <p>' XP001028046</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	1-8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/01612

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9733173	A	12-09-1997	AU	2208097 A	22-09-1997
			WO	9733173 A1	12-09-1997
DE 29709820	U	31-07-1997	DE	29709820 U1	31-07-1997
			PL	320472 A1	22-12-1997
WO 9602241	A	01-02-1996	US	5583101 A	10-12-1996
			AU	3008395 A	16-02-1996
			CA	2194991 A1	01-02-1996
			JP	10511075 T	27-10-1998
			WO	9602241 A1	01-02-1996
			US	5545614 A	13-08-1996
WO 9901427	A	14-01-1999	AU	726861 B2	23-11-2000
			AU	8281598 A	25-01-1999
			EP	1000023 A2	17-05-2000
			WO	9901427 A2	14-01-1999
			US	6232336 B1	15-05-2001
WO 9813358	A	02-04-1998	AU	733590 B2	17-05-2001
			AU	4595797 A	17-04-1998
			EP	0929538 A1	21-07-1999
			WO	9813358 A1	02-04-1998
EP 0870763	A	14-10-1998	AU	6077798 A	15-10-1998
			CA	2234571 A1	10-10-1998
			CN	1202486 A	23-12-1998
			EP	0870763 A1	14-10-1998
			HU	9800865 A2	28-01-1999
			JP	3060214 B2	10-07-2000
			JP	11171866 A	29-06-1999
			NO	981658 A	12-10-1998
			TW	427979 B	01-04-2001
			US	6110930 A	29-08-2000
			US	6228866 B1	08-05-2001
			ZA	9803009 A	22-10-1998
WO 9725984	A	24-07-1997	US	5789442 A	04-08-1998
			AU	721998 B2	20-07-2000
			AU	1703197 A	11-08-1997
			BR	9707026 A	20-07-1999
			CN	1208346 A	17-02-1999
			CZ	9802243 A3	17-03-1999
			EP	0874627 A1	04-11-1998
			JP	11512748 T	02-11-1999
			NO	983288 A	17-09-1998
			PL	327823 A1	04-01-1999
			SK	91798 A3	10-12-1999
			WO	9725984 A1	24-07-1997
			US	6028106 A	22-02-2000
			ZA	9700458 A	14-07-1998
WO 9528377	A	26-10-1995	WO	9528377 A1	26-10-1995
US 5885621	A	23-03-1999	AU	720686 B2	08-06-2000
			AU	2440397 A	29-10-1997
			BR	9708601 A	03-08-1999
			CA	2251530 A1	16-10-1997



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/01612

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5885621	A	CN 1227485 A	01-09-1999
		EP 0914103 A1	12-05-1999
		JP 2000510448 T	15-08-2000
		WO 9737644 A1	16-10-1997
<hr/>			



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
21 décembre 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/76451 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: **A61K**

Bois (FR) **LEPRINCE, Christiane** [FR/FR]; 44, allée de
la Mare l'Oiseau, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01612

(74) Mandataires: **BREESE, Pierre** etc.; Breesse-Majerow-
icz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international: 9 juin 2000 (09.06.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/07442 11 juin 1999 (11.06.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794
Paris Cedex 16 (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **ISRAEL,**
Maurice [FR/FR]; 2, rue Aristide Briand, F-91440 Bu-
res-sur-Yvette (FR). **DE LA PORTE, Sabine** [FR/FR];
86, rue Royale, F-78000 Versailles (FR). **FOSSIER,**
Philippe [FR/FR]; 11, rue Victor Baron, F-95380 Louvres
(FR). **CHAUBOURT, Emmanuel** [FR/FR]; 18, route de
Montignac, F-16330 Vars (FR). **BAUX, Gérard** [FR/FR];
7, avenue des Bois Clairs, F-91700 Sainte Geneviève des

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING NO OR AT LEAST A NO DONOR COMPOUND OR AN-
OTHER COMPOUND CAPABLE OF RELEASING OR INDUCING NO FORMATION IN CELLS

(54) Titre: COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT DU NO OU AU MOINS UN COMPOSE DONNEUR DE
NO OU ENCORE UN COMPOSE CAPABLE DE LIBERER OU D'INDUIRE LA FORMATION DE NO DANS LES CELLULES

(57) Abstract: The invention concerns the use of NO, a NO donor compound or a compound capable of releasing, stimulating or
inducing NO formation in cells to prepare a medicine for treating or preventing a disease resulting from deficiency of an adult gene
in a person for the re-expression of said homologous foetal gene. The invention particularly concerns the treatment of Duchenne or
Becker muscular dystrophy, or thalassemia or sickle cell disease.

(57) Abrégé: La présente invention concerne l'utilisation de NO, d'un composé donneur de NO ou d'un composé capable de li-
bérer, de favoriser ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou
à la prévention d'une maladie résultant de la déficience d'un gène adulte chez un individu par la ré-expression dudit gène foetale
homologue. La présente invention concerne tout particulièrement le traitement des dystrophies musculaires, comme la dystrophie
musculaire de Duchenne ou de Becker, ou la thalassémie ou la drépanocytose.

WO 00/76451 A2



COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT DU NO OU AU MOINS UN COMPOSE DONNEUR DE NO OU ENCORE UN COMPOSE CAPABLE DE LIBERER OU D'INDUIRE LA FORMATION DE NO DANS LES CELLULES.

5

10

15

20

25

L'invention a pour objet une composition pharmaceutique comprenant du NO ou au moins un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules, comme un donneur de NO ou un substrat de la NO synthase, pour ré-exprimer une protéine fœtale dont l'isoforme adulte est mutée et/ou absente. L'invention trouve donc son intérêt dans le traitement des maladies où un gène adulte est défectueux ou absent. A titre d'exemple, l'utrophine, la forme homologue fœtale de la dystrophine peut remplacer cette dernière dans les myopathies de Duchenne et de Becker. De même l'hémoglobine fœtale peut remplacer l'hémoglobine adulte dans les cas de thalassémie et de drépanocytose. La présente invention est donc remarquable en ce qu'elle permet de remplacer les méthodes de traitement de ces pathologies proposées à ce jour par la voie du NO pour activer l'expression de la protéine fœtale. L'invention se rapporte donc tout particulièrement à l'utilisation de NO, d'un donneur de No ou d'un composé capable de libérer ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des myopathies de Duchenne et Becker et des thalassémies et drépanocytose.

30

Les travaux réalisés sur la drépanocytose et la thalassémie ont mis en évidence que l'hydroxy-urée et le

butyrate sont capables de réactiver l'expression du gène fœtal de l'hémoglobine. Ce résultat pourrait être expliqué par des phénomènes métaboliques communs. Le cycle de l'urée et le cycle de Krebs sont couplés et si l'hydroxy-urée interfère avec le cycle de l'urée, elle pourrait conduire à une rétro-régulation du cycle de Krebs, ce qui entraînerait une plus faible consommation de l'acétyl-CoA et ainsi la formation de corps cétoniques comme le bêta-hydroxybutyrate.

Les phénomènes métaboliques associés à l'expression de gènes fœtaux correspondent à un faible métabolisme oxydatif et à une forte glycolyse. Ainsi, l'analyse histochimique de fibres musculaires fœtales a montré que ce sont davantage les enzymes glycolytique que les enzymes oxydatives qui sont exprimées. En outre, il a été montré que le mode de sécrétion de l'azote chez l'embryon est plutôt ammonotélique que ureotélique ce qui correspond à un fonctionnement ralenti du cycle de l'urée. Dans ces conditions, la L-arginine, qui est un substrat essentiel du cycle de l'urée, est détournée vers d'autres voies comme celles de la NO-synthase (NOS) ou de l'amidinotransférase, conduisant ainsi à une augmentation des niveaux d'oxyde nitrique (NO) et de créatine chez l'embryon.

La compréhension de ces phénomènes métaboliques ont conduit les inventeurs à reproduire cette situation métabolique chez des animaux adultes et dans des systèmes de cellules en culture et ainsi de montrer que l'utilisation de L-arginine et de NO permettait de réactiver l'expression de gènes fœtaux dans des tissus

adultes de façon à restaurer la présence et la localisation de protéines fœtales.

Les travaux ayant conduit à la présente invention ont été réalisés dans le but de traiter, par cette nouvelle stratégie de réactivation d'un gène fœtal, des malades atteints de myopathies de Duchenne et Becker ou de thalassémie et drépanocytose, mais la compréhension des phénomènes métaboliques rapportées ci-dessus permettent de les transposer aux traitement de toute maladie où le gène adulte défectueux a un homologue fœtal.

La dystrophie musculaire de Duchenne, ci-après désignée DMD, est une maladie génétique lié au chromosome X dans laquelle on observe un manque d'une protéine du cytosquelette membranaire, la dystrophine, conduisant à une dégénérescence musculaire progressive. Trois types de traitement de la DMD sont envisagés aujourd'hui, un traitement pharmacologique avec des glucocorticoïdes, la transplantation de myoblastes et la thérapie génique (10). Il a aussi été proposé de compenser la perte de dystrophine en réactivant l'expression de l'utrophine. En effet, il semble que l'utrophine soit capable de réaliser les mêmes fonctions cellulaires que la dystrophine et puisse ainsi compenser l'absence de dystrophine (3, 7). L'utrophine est observée dans les muscles à la fois chez les patients atteints de DMD et chez les témoins (24). Bien que chez l'adulte le gène de l'utrophine ne soit pas totalement éteint, l'utrophine est considérée comme l'homologue fœtal de la dystrophine. Ce qui change chez l'adulte est sa localisation : elle n'est plus trouvée dans le sarcolemme, où elle est remplacée par la dystrophine, mais elle

persiste dans les cellules satellites, les jonctions neuromusculaires et les capillaires (20) où la NO-synthase (NOS) est particulièrement abondante. Parmi les différentes isoformes de la NOS, il existe une forme spécifique du muscle, la NOS-mu, qui est une isoforme issue d'un épissage alternatif présentant une activité catalytique équivalente à celle de l'isoforme neuronale (34). La NOS a été observée dans le sarcolemme à la fois des fibres à contraction rapide et lente (17, 31). Dans le cas des souris mdx, un modèle animal de la DMD, la NOS n'est pas ancrée dans le sarcolemme mais délocalisée à l'intérieur des fibres musculaires (5). Il a en outre été montré récemment que la localisation de la NOS a été restaurée après transfection du gène de la dystrophine dans les muscles des souris mdx (9). Ce qui suggère la participation de cette enzyme ou de son produit dans l'assemblage du complexe protéique présent sous le sarcolemme. Compte-tenu de ces observations, les Inventeurs ont mis en évidence la possibilité d'utiliser le NO pour ré-exprimer l'utrophine, l'hémoglobine fœtale ou d'autres protéines fœtales. On a proposé dans l'art antérieur, l'emploi de vasodilatateurs, comme des bains chauds, mais l'effet du NO ou d'un composé donneur de NO sur la ré-expression de l'utrophine et de l'hémoglobine fœtale n'a jamais été décrit.

Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention ont montré que dans des myotubes en culture, la L-arginine et les composé donneurs de NO augmente à la fois le niveau et la localisation membranaire d'utrophine. Après injection de L-arginine dans les muscles, la localisation d'utrophine au niveau de la

membrane de la fibre musculaire apparaît chez les souris témoins et augmente chez les souris mdx (qui présentent une faible sur-expression naturelle).

5 Les mécanismes qui conduisent à l'expression et la localisation de l'utrophine au niveau du sarcolemme ne sont pas clairs. Le NO pourrait être capable de nitrer les tyrosines de certains facteurs de transcription qui sont normalement phosphorylés, favorisant ainsi l'expression de l'utrophine dans les myotubes et son adressage vers la membrane. Une autre explication pourrait être que le NO agit via la production de GMPc comme suggéré par la réduction de son action en présence d'OQD, un inhibiteur sélectif de la guanylate cyclase. Le produits de dégradation de la L-arginine pourrait ainsi contrôler l'organisation complexe des protéines sous la membrane de la fibre musculaire.

10 L'ARNm de l'utrophine dans le muscle a été observé tout au long du sarcolemme, avec une expression préférentielle au niveau de la jonction neuromusculaire (14, 40). Jusqu'à présent, deux molécules exprimées à la jonction neuromusculaire, l'agrine et l'hereguline neurales, ont été identifiées comme capable d'augmenter respectivement l'expression d'utrophine dans le cytoplasme (15) et les niveaux d'ARNm de l'utrophine (16). Mais la possibilité d'utiliser ces molécules dans le traitement de la DMD reste à démontrer.

20 Le but de la présente invention est donc d'offrir une nouvelle stratégie de traitement de maladies résultant de la déficience d'un gène adulte en restaurant l'activité d'un gène fœtal homologue audit gène adulte.

Ce but est atteint grâce à l'utilisation de NO, d'un composé donneur de NO ou d'un composé capable de libérer, d'induire ou de favoriser la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une maladie résultant de la déficience d'un gène adulte chez un individu possédant un gène fœtal homologue audit gène adulte grâce à la ré-expression du gène fœtale homologue lorsqu'il existe.

La méthode de traitement selon l'invention peut être utilisée en lieu et place par l'hydroxyurée ou le butyrate par exemple dans le cas de thalassémie et drépanocytose.

On entend tout par composé capable de libérer ou d'induire la formation NO, des composés comme des donneurs de NO ou des composés capable de favoriser la formation de NO dans le cellules.

Plus particulièrement, l'invention vise l'utilisation de NO, d'un composé donneur de NO ou d'un composé capable de libérer, de favoriser ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné à réactiver l'expression d'au moins un gène fœtal dans des tissus adultes de façon à restaurer la présence et/ou la localisation d'au moins une protéine fœtale.

L'utilisation selon l'invention permet de réactiver la situation fœtale en ré-exprimant la forme embryonique de la protéine codée par le gène défectueux.

Certains composés comme l'hydroxyurée ou le bêta-hydroxybutyrate sont toxiques ou mal tolérés, aussi

l'invention concerne plus particulièrement, à titre de composé capable d'induire la formation de NO, la L-arginine, ou ses dérivés comme l'hydroxy-arginine ou ses dérivés borés, qui favorisent la production de NO ou la préservation du substrat. Dans une forme de mise en œuvre préférée de l'invention, la L-arginine est administrée à raison de 200 mg/kg pendant 3 à 4 semaines

Mais l'invention concerne très largement, l'utilisation des donneurs de NO ou de composés impliqués dans des voies métaboliques permettant d'augmenter la production cellulaire de NO.

Il est connu que les dystrophies de Duchenne et de Becker sont liées à la délétion ou à la mutation d'un gène du chromosome X. Ainsi, la dystrophine est une protéine essentielle à la fonction musculaire, dont l'absence ou la mutation conduit à une dégénérescence du muscle. La maladie évolue graduellement au fur et à mesure que le muscle dégénère en raison de l'absence de dystrophine. La présente invention vise précisément à réactiver la protéine embryonnaire qu'est l'utrophine pour traiter ou prévenir la DMD. Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention ont montré que l'injection d'une composition pharmaceutique comprenant du NO ou au moins un composé donneur de NO ou encore capable de libérer, de favoriser ou d'induire la formation de NO dans les cellules, permet d'induire l'apparition d'utrophine au niveau du sarcolemme de muscles dystrophique et normaux, *in vitro* sur des cultures de myotubes. De même *in vivo*, on observe que l'injection d'une telle composition chez la

souris entraîne une expression importante d'utrophine au niveau du sarcolemme.

En conséquence, l'invention se rapporte tout particulièrement à l'utilisation de NO et/ou d'au moins un composé donneur de NO ou d'un capable de libérer, de favoriser ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament pour ré-exprimer la protéine fœtale comme roue de secours de la protéine adulte déficiente. Tout particulièrement, la méthode de l'invention permet de réactiver l'expression de l'utrophine dans des tissus adultes de façon à restaurer la présence et la localisation de cette protéine au niveau du sarcolemme, de façon à ce que l'utrophine remplace la dystrophine lorsque celle-ci est absente.

L'invention concerne donc également une composition pharmaceutique comprenant du NO ou au moins un composé donneur de NO ou encore capable de libérer, de favoriser ou d'induire la formation de NO dans les cellules, associé dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour une administration per os, per cutanée, intraperitonéale, intraveineuse ou sous-cutanée.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront de la description qui suit rapportant les travaux réalisés dans le cadre de l'invention sur la DMD.

La DMD (11) la plus fréquente (1 garçon sur 3500) et la plus sévère myopathie, est caractérisée par une

5 perte progressive de la force musculaire, conduisant finalement à une fibrose marquée et une infiltration graisseuse. Le gène de la DMD (25) couvre environ 2300 kb sur la bande p21 et la plupart des mutations de la DMD sont des délétions intragéniques, conduisant à l'absence de dystrophine, une protéine de 427 kD, dans le muscle des patients (18, 1). La dystrophine est une large protéine du cytosquelette localisée à la surface interne du sarcolemme du muscle normal. La dystrophine est associée à un complexe de glycoprotéines et de protéines de membrane respectivement dénommées DAGs, désignant le termes anglais "dystrophin-associated glycoproteins", et DAPs, désignant le termes anglais (dystrophin-associated proteins), qui sont considérablement réduites dans le muscle des patients atteints de DMD (2, 28). L'une des protéines, la syntrophine, est associée à la NOS via un domaine PDZ (4). Le complexe dystrophine - glycoprotéine lie le cytosquelette subsarcolemmal à la matrice extracellulaire. La dystrophine est impliquée dans le maintien de la structure morphologique et fonctionnelle de la fibre du muscle strié et dans l'homéostasie du calcium.

20 Un transcrit autosomal de 13 kb codé par un gène du bras long du chromosome 6 chez l'homme et le chromosome 10 chez la souris, a été identifié. Il code une protéine présentant plus de 80% d'homologie avec la dystrophine, dénommée l'utrophine, de 395 kD (23, 36). L'homologie entre la dystrophine et l'utrophine s'étend sur toute leur longueur suggérant qu'elles dérivent d'un gène ancestral commun. L'utrophine, comme la dystrophine, se lie à actine par le domaine N-terminal et le domaine C-terminal

est hautement conservé. L'utrophine est associée à un complexe des protéines sarcolemmales identiques ou au moins antigéniquement similaire à ceux de la dystrophine. Sa localisation est la même que celle du récepteur à l'acétylcholine, en haut des plis post-synaptiques. L'utrophine est peut être l'une des molécules du cytosquelette qui organise et stabilise le domaine cytoplasmique du récepteur de l'acétylcholine.

Les patients atteints de DMD et de dystrophie de Becker, (une forme moins sévère de DMD) et la souris mdx, conserve une certaine expression de l'utrophine au niveau du sarcolemme (35, 20, 21, 24) probablement pour compenser l'absence de dystrophine. Les méthodes pour post-réguler l'expression du gène de l'utrophine sont bénéfiques pour la fonction musculaire. Par exemple, l'utilisation de l'expression transgénique d'abord de l'utrophine tronquée puis l'utrophine complète chez la souris, a permis de démontrer que l'utrophine peut fonctionnellement remplacer la dystrophine (8, 38, 39) : la surexpression d'utrophine conduit à la restauration de tous les composants des DAGs, et la performance du muscle est augmentée. La surexpression de l'utrophine sauve la détérioration du diaphragme, le muscle le plus sévèrement atteint chez la souris mdx. Par ailleurs, les souris déficientes en utrophine présentent un phénotype de myopathie légère, comme les souris mdx déficientes en dystrophine, mais les souris déficientes à la fois en dystrophine et utrophine présentent une myopathie sévère des muscles du squelette et cardiaque (33). L'expression d'un transgène de l'utrophine tronquée dans le muscle de souris déficientes à la fois en

dystrophine et utrophine protège du décès et du développement de tout phénotype clinique (30).

5 Au cours du développement, l'utrophine est trouvée à la surface membranaire des fibres immatures chez les embryons normaux et est progressivement remplacée par la dystrophine, exceptée à la jonction neuromusculaire où elle persiste (26). Ainsi, il est possible de considérer l'utrophine comme l'homologue fœtal de la dystrophine (36).
10 Plusieurs observations ont mis en lumière le mécanisme qui gouverne le passage du gène fœtal au gène adulte. Les patients atteints de drépanocytose ou de thalassémie qui présentent un gène adulte de l'hémoglobine anormal ont été traités avec le butyrate ou l'hydroxy-urée, ce qui a réactivé le gène fœtal de l'hémoglobine (32, 29, 27). Il
15 est possible d'escompter chez le fœtus un niveau élevé de glycolyse (12, 6) avec un passage préférentiel de l'acétyl-CoA vers les voies anaboliques. La faible phosphorylation oxydative devrait favoriser les voies de l'acétyl-CoA vers les corps cétoniques. L'accumulation conséquente de bêta-hydroxybutyrate pourrait alors induire l'expression des
20 gènes fœtaux. Comme le cycle de Krebs et le cycle de l'urée sont couplés, la faible phosphorylation oxydative est corrélée avec la faible production d'urée, laquelle peut aussi être induite par un traitement à l'hydroxy-urée. Ceci
25 pourrait résulter en des taux élevés de L-arginine, qui pourrait alors être utilisée comme substrat de la NOS et de l'amidinotransférase conduisant ainsi à la créatine. L'oxyde nitrique (NO) donnerait alors le signal de l'expression des gènes fœtaux, qui serait alors responsable
30 des hauts niveaux de créatine observé dans l'urine des

patients atteints de DMD. Les mécanismes envisagés ci-dessus par les inventeurs, les ont conduit à tester les effets de la L-arginine et de composés donneurs de NO sur l'expression d'utrophine. Les inventeurs ont ainsi
5 démontrer que de façon remarquable chez les souris adultes normales et mdx traitées chroniquement avec de la L-arginine, qui est un substrat de la NOS, les taux d'utrophine musculaires augmentaient au niveau de la membrane tout au long du sarcolemme. Les expériences
10 rapportées ci-après montre que de façon surprenante le traitement par la L-arginine, des donneurs de NO, augmente les niveaux d'utrophine et sa localisation membranaire dans des cultures de myotubes normaux et mdx. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'hydroxy-urée qui a servi
15 de référence car il est connu que ce produit active l'hémoglobine foetale.

I - Méthode.

20 1) Traitement des souris.

Trois souris adultes de 18 mois normales (lignée C57 BL/6) et trois souris mdx ont reçu quotidiennement une injection intrapéritonéale de 200 mg/kg de L-arginine pendant trois semaines. Deux autres groupes
25 de trois souris adultes ont servi de contrôle et ont reçu quotidiennement une injection de sérum physiologique.

Les souris ont été sacrifiées par anesthésie à l'éther, le biceps femoris et les muscles semi-tendineux ont été rapidement disséqués à partir des membres

postérieures de chaque animal et congelés dans de l'azote liquide.

2) Culture cellulaire.

Des myotubes ont été obtenus à partir d'une lignée cellulaire normale (NXLT) et une lignée cellulaire mdx comme décrit par Liberona et al. (22) et les myotubes C2 comme décrit par Inestrosa et al. (19).

3) Immunofluorescence.

In vivo. Après fixation avec du méthanol froid (-20°C pendant 10 minutes), les coupes de 7 µm ont été incubées pendant deux heures avec un anticorps monoclonal spécifique de l'utrophine (NCL-DRP 2, Novacastra) (1/10 vol/vol) dans du PBS contenant 0,1% de saponine et 0,2% d'albumine bovine. Le second anticorps marqué à la fluoroscéine (N 1031, Amersham) a été dilué (1/4000 vol/vol) dans du PBS contenant 0,1% de saponine et incubé pendant une heure.

In vitro. Les cultures ont été traitées comme décrit précédemment à l'exception du second anticorps marqué à la fluoroscéine qui a été dilué à 1/100 vol/vol. La durée d'incubation a été de 2 heures pour le premier et le second anticorps.

4) Immunoblotting.

Les myotubes obtenus à partir des lignées NXLT, XLT et C2 ont été homogénéisés avec un Polytron (Kinematica) dans 10 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% Triton X-100, 1% SDS, 0,5% deoxycholate de sodium sur glace. La quantité

de protéines totales a été déterminée par le protocole du test protéique à l'acide bicinchoninique (BCA; Pierce). Des quantités équivalentes de protéine ont été séparées par SDS-Page sur un gel à 5%, puis électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell). Les membranes ont ensuite été incubées avec le même anticorps monoclonal dirigé contre l'utrophine utilisé pour les techniques d'immunofluorescence (1/250 vol/vol). Les anticorps fixés ont été détectés avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris de Sanofi (1/5000 vol/vol) liés à la peroxydase de raifort et révélés par réaction de chimeluminescente (ECL, Amersham Pharmacie Biotech).

II - Résultats.

Il sera fait référence dans les résultats qui suivent aux illustrations en annexe dans lesquels :

- La figure 1 représente l'apparition de l'utrophine sous le sarcolemme de souris adultes normales et mdx traitées chroniquement avec la L-arginine (grossissement X 300). La figure 1 montre l'immunolocalisation de l'utrophine sur la membrane des muscles des souris normales et mdx traitées à la L-arginine. (a) contrôle correspondant aux souris normales ayant reçu une injection de sérum physiologique ; pas d'utrophine observée au niveau du sarcolemme. (b) souris normales traitées à la L-arginine : on observe l'utrophine sous le sarcolemme. (c) contrôle correspondant aux souris mdx ayant reçu une injection de sérum physiologique : de l'utrophine est visible au niveau du sarcolemme. (d) souris

mdx ayant reçu de la L-arginine : augmentation des niveaux d'utrophine sous le sarcolemme.

- La figure 2 représente la variation d'utrophine dans les myotubes après traitement impliquant l'oxyde nitrique (NO) (grossissement X 300). A, a-h : lignée cellulaire normale (NXLT). B, a'-h' : lignée cellulaire mdx (XLT). Les cultures cellulaires ont été traitées par exposition des myotubes différenciés aux drogues pendant 48 heures. A, a' : cultures contrôles. B, b' : L-arginine ($2 \cdot 10^{-3}$ M). c, c' : SIN-1 (10^{-3} M). d, d' : SIN-1 (10^{-3} M) + L-arginine (10^{-3} M). e, e' : D-arginine (10^{-3} M). f, f' : L-arginine (10^{-3} M) + OGD (10^{-5} M). g, g' : L-NMMA (10^{-3} M). h, h' : hydroxyurée (10^{-4} M).

- La figure 3 représente l'augmentation des niveaux d'utrophine dans les myotubes NXLT, XLT et C2 par l'action de la L-arginine. Les analyses en immunoblot de l'utrophine ont été réalisées sous des conditions de contrôle (CTRL) et après 48 heures de traitement avec $2 \cdot 10^{-3}$ M de L-arginine (L-arg).

Les souris adultes ayant reçu une injection intrapéritonéale de L-arginine pendant trois semaines ont été sacrifiées. Après sacrifice, les muscles de la cuisse ont été préparées par immunocytochimie. Après ce traitement, l'utrophine a été révélée au dessous du sarcolemme dans les fibres musculaires des souris normales comme montré sur la figure 1a. Le traitement avec la L-arginine des souris mdx a augmenté le niveau d'utrophine déjà présent dans le sarcolemme (35, 21). A la fois dans les souris normales et mdx, l'immunomarquage couvre le

sarcolemme et est présent sur une partie du tissu interstitiel. Ce marquage est probablement dû à l'utrophine exprimé par les capillaires et les cellules satellites.

5 Cet effet de l'arginine a ensuite été étudié sur des myotubes en culture qui sont plus adaptés pour une application directe des drogues et qui évitent l'interférence avec de l'utrophine non musculaire. Les myotubes NXLT et XLT des souris normales et mdx, respectivement, ont été utilisés dans des tests
10 immunochimiques des effets de la L-arginine et du NO sur l'expression d'utrophine. Après 48 heures de traitement, le marquage de l'utrophine a augmenté lorsque l'on a augmenté la synthèse de NO endogène via un excès de L-arginine et lorsque l'on a appliqué le SIN-1 comme montré sur la figure
15 2. L'utrophine a été co-localisée avec les larges amas de récepteurs à l'acétylcholine présents sur les myotubes attestant qu'une partie du marquage est membranaire (non illustré en annexe). L'augmentation du marquage de l'utrophine a été aussi observé à un plus faible degré sur
20 les cellules de myotubes C2 de souris et les myotubes primaires de rat. L'application cumulée de SIN-1 et de L-arginine augmente encore le marquage de l'utrophine comme montré sur la figure 2. L'absence d'effet de la D-arginine rapporté sur la figure 2 démontre l'implication du NO dans
25 la méthode de l'invention. Le niveau basal d'utrophine en l'absence d'activité de NO-synthétase de la figure 2 a été obtenu après application de N^G-méthyl-L-arginine (L-NMMA), qui est un inhibiteur des NOS. Il est largement admis que les effets intracellulaires du NO sont médiés à travers
30 l'activation de la guanylate cyclase soluble. La synthèse

d'utrophine induite par le NO a été inhibée en présence de ODQ (13), qui est un antagoniste spécifique de la guanylate cyclase comme montré sur la figure 2. La figure 2 montre également que l'hydroxy-urée utilisée par analogie avec le traitement de la thalassémie, augmente également de façon remarquable le marquage de l'utrophine. Cet effet résulte probablement d'une action sur l'expression de l'utrophine.

Afin de compléter l'analyse de l'effet de la production de NO sur l'expression d'utrophine chez les souris normales et mdx, les inventeurs ont extraits les protéines des cultures de myotubes traitées ou non avec la L-arginine dans les mêmes conditions que précédemment. Les western-blots de la figure 3 montrent une augmentation claire de l'utrophine dans les deux types de lignées cellulaires, confirmant ainsi les données immunocytochimiques. Cette augmentation en utrophine après traitement par la L-arginine a été confirmée dans une lignée cellulaire de myotubes C2 (figure 3).

Références bibliographiques

1. Ahn, A. H., & Kunkel, L. M. (1993) The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* **3**, 283-291.
- 5 2. Appel, E. D., Roberds, S. L., Campbell, K. P., & Merlie, J. P (1995) Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. *Neuron* **15**, 115-126.
3. Blake, D. J., Tinsley, J. M., & Davies, K. E. (1996)
10 Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.* **1**, 37-47.
4. Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C., & Brecht, D. S.
15 (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and β 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* **84**, 757-767.
5. Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., & Brecht, D. S. (1995) Nitric oxide synthase complexed with
20 dystrophin and absent from skeletal sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **82**, 743-752.
6. Butler-Browne, G. S., Barbet, J. B., & Thornell, L. E. (1990) Myosin heavy and light chain expression during

human skeletal muscle development and precocious muscle maturation induced by thyroid hormone. *Anat. Embryol.* (Berl.) **181**, 513-522.

7. Campbell, K. P., & Crosbie, R. H. (1996) Utrophin to the rescue. *Nature* **384**, 308-309.

8. Deconinck, N., Tinsley, J., DeBacker, F., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, D., Davies, K., & Gillis, J.M. (1997) Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nature Medicine* **3**, 1216-1221.

9. Decrouy, A., Renaud, J. M., Lunde, J. A., Dickson, G., & Jasmin, B. J. (1998) Mini- and full-length dystrophin gene transfer induces the recovery of nitric oxide synthase at the sarcolemma of mdx4cv skeletal muscle fibers. *Gene Ther.* **5**, 59-64.

10. De La Porte, S., Morin, S., & Koenig, J. (1999) Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int. Rev. Cytol.* **191**, 99-148.

11. Engel, A. G., Yamamoto, M., & Fischbeck, K. H. (1994) Dystrophinopathies, in: *Myology* (McGraw-Hill, Inc.) **2**, 1133-1187.

12. Farkas-Bargeton, E., Diebler, M. F., Arsenio-Nunes, M. L., Wehrle, R., & Rosenberg, B. (1977) Histochemical,

quantitative and ultrastructural maturation of human foetal muscle. *J. Neurol. Sci.* **31**, 245-259.

- 5 13. Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C. L., Nielsen, E. B., Schmidt, K., & Mayer, B. (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-(1,2,4) oxadiazolo (4,3-a) quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* **48**, 184- 188.
- 10 14. Gramolini, A. O., Dennis, C. L., Tinsley, J. M., Robertson, G.S., Cartaud, J., Davies, K. E. & Jasmin, B. J. (1997) Local transcriptional control of utrophin expression at the neuromuscular synapse. *J. Biol. Chem.* **272**, 8117-8120.
- 15 15. Gramolini, A. O., Burton, E. A., Tinsley, E.A., Ferns, M. J., Cartaud, A., Cartaud, J., Davies, K. E., Lunde, J. A., & Jasmin, B. J. (1998) Muscle and neuronal isoforms of agrin increase utrophin expression in cultured myotubes via transcriptional regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **273**, 736-743.
- 20 16. Gramolini, A. O., Angus, L. M., Schaeffer, L., Burton, E. A., Tinsley, J. M., Davies, K. E., Changeux, J. P., & Jasmin, B. J. (1999) Induction of utrophin gene expression by heregulin in skeletal muscle cells:: role

of the N-box motif and GA binding protein. *Proc. Natl. Acad. USA* **96**, 3223-3227.

17. Grozdanovic, Z., Gosztonyi, G., & Gossrau, R. (1996) Nitric oxide synthase 1 (NOS-1) is deficient in the sarcolemma of striated muscle fibers in patients with Duchenne muscular dystrophy, suggesting an association with dystrophin. *Acta Histochem.* **98**, 61-69.

18. Hoffman, E. P., Brown, R H., & Kunkel, L. M. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919-928 .

19. Inestrosa, N. C., Miller, J. B., Silberstein, L., Ziskind-Conhaim, L., & Hall, Z. W. (1983) Developmental regulation of 16S acetylcholinesterase and acetylcholine receptors in a mouse muscle cell line. *Exp. Cell Res.* **147**, 393-405.

20. Karpati, G., Carpenter, S., Morris, G. E., Davies, K. E., Guerin, C., & Holland, P. (1993) Localization and quantification of the chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in normal and pathological human muscle. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* **52**, 119-128.

21. Koga, R., Ishiura, S., Takemitsu, M., Kamakura, K., Matsuzaki, T., Arahata, K., Nonaka, I., & Sugita, H.

(1993) Immunoblot analysis of dystrophin-related protein (DRP). *Biochim. Biophys. Acta* **1180**, 257-261.

22. Liberona, J. L., Powell, J. A., Shenoi, S., Petherbridge, L., Caviedes, R., & Jaimovich, E. (1998).

5 Differences in both inositol 1, 4, 5,-triphosphate mass and inositol 1, 4, 5-triphosphate receptors between normal and dystrophic skeletal muscle cell lines. *Muscle & Nerve* **21**, 902-909.

23. Love, D. R., Hill, D. F., Dickson, G., Spurr, N. K.,

10 Byth, B. C., Marsden, R. F., Walsh, F. S., Edwards, Y. H., & Davies, K. E. (1989) An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* **339**, 55-58.

24. Mizuno, Y., Nonaka, I., Hirai, I., & Ozawa, E. (1993)

15 Reciprocal expression of dystrophin and utrophin in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients, female DMD-carriers and control subjects. *J. Neurol. Sci.* **119**, 43-52.

25. Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C.,

20 Bertelson, C. J., Kurnit, D. M., & Kundel, L. M. (1986) Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature (London)* **323**, 646-650.

26. Oliver, L., Goureau, O., Courtois, Y., & Vigny, M. (1996) Accumulation of NO synthase (type-1) at the neuromuscular junctions in adult mice. *NeuroReport* **7**, 924-926.
- 5 27. Olivieri, N. F., & Weatherall, D. J. (1998) The therapeutic reactivation of foetal haemoglobin. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1655-1658.
- 10 28. Ozawa, E., Yoshida, M., Suzuki, A., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., & Noguchi, S. (1995) Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum. Molec. Genet.* **4**, 11711-11716.
- 15 29. Perrine, S. P., Ginder, G. D., Faller, D. F., Dover, G. H., Ikuta, T., Witkowska, E., Cai, S. P., Vichinsky, E. P., & Olivieri, N. F. (1993) A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the β -globin disorders. *N. Engl. J. Med.* **328**, 81-86.
- 20 30. Rafael, J. A., Tinsley, J. M., Potter, A. C., Deconinck, A. E. & Davies, K. E. (1998) Skeletal muscle-expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nature Genetics* **19**, 79-82.
31. Ribera, J., Marsal, J., Casanovas, A., Hukkanen, M., Tarabal, O., & Esquerda, J. E. (1998) Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve

terminals of Torpedo electric organ: its role as regulator of acetylcholine release. *J. Neurosci. Res.* **51**, 90-102.

32. Rodgers, G. P., Dover, G. J., Uyesaka, N., Noguchi, C. T., Schechter, A. N., & Nienhuis, A. W. (1993) Augmentation by erythropoietin of the fetal-hemoglobin response to hydroxyurea in sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* **328**, 73-80.

33. Sanes J. R. & 20 co-authors (1998) Development of the neuromuscular junction:: genetic analysis in mice. *J. Physiol.* **92**, 167-172.

34. Silvagno, F., Xia, H. H., & Bredt, D. S. (1996) Neuronal nitric-oxide synthase-mu, an alternative spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **271**, 11204-11208.

35. Takemitsu, M., Ishiura, S., Koga, R., Kamakura, K., Arahata, K., Nonaka, I., & Sugita, H. (1991) Dystrophin-related protein in fetal and denervated skeletal muscles of normal and mdx mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **180**, 1179-1186.

36. Tinsley, J. M., & Davies, K. E. (1993) Utrophin: a potential replacement for dystrophin? *Neuromusc. Disord.* **3**, 537-539.

37. Tinsley, J. M., Blake, D. J., Pearce, M., Knight, A. E., Kendrick-Jones, J., & Davies, K. E. (1993) Dystrophin and related proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 484-490.
38. Tinsley, J. M., Potter, A. C., Phelps, S. R., Fisher, R., Trickett, J. I., & Davies, K. E. (1996) Amelioration of the dystrophic phenotype of *mdx* mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* **384**, 349 -353.
39. Tinsley, J. M., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J. M., & Davies, K. E. (1998) Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in *mdx* mice. *Nat. Med.* **4**, 1441 - 1444.
40. Vater, R., Young, C., Anderson, L. V. B., Lindsay, S., Blake, D. J., Davies K. E., Zuellig, R., & Slater, C. R. (1998) Utrophin mRNA expression in muscle is not restricted to the neuromuscular junction. *Mol. Cell. Neurosci.* **10**, 229 -242.

REVENDICATIONS

1) Utilisation de NO, d'un composé donneur de NO ou d'un composé capable de libérer, de favoriser ou d'induire la formation de NO dans les cellules pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une maladie résultant de la déficience d'un gène adulte chez un individu par la ré-expression dudit gène fœtale homologue.

2) Utilisation de NO ou d'un composé donneur de NO ou encore capable de libérer, de favoriser ou d'induire la formation de NO dans les cellules selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit médicament est destiné à réactiver l'expression d'au moins un gène fœtal dans des tissus adultes de façon à restaurer la présence et/ou la localisation d'au moins une protéine fœtale.

3) Utilisation selon l'une quelconque des revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le gène fœtal code pour la forme embryonnaire de la protéine codée par le gène défectueux.

4) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le composé capable d'induire la formation de NO est la L-arginine, ou un de ses dérivés constituant un substrat de la NO-synthase ou favorisant la disponibilité du substrat.

5) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que le gène défectueux est le gène de la dystrophine et le gène fœtal est le gène de l'utrophine.

5

6) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que le gène défectueux est le gène de l'hémoglobine et le gène fœtal est le gène de l'hémoglobine foetale.

10

7) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la maladie résultant de la déficience d'un gène adulte est une dystrophie musculaire, comme la dystrophie musculaire de Duchenne ou de Becker, ou la thalassémie ou la drépanocytose.

15

8) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend du NO et/ou au moins un donneur de NO, ou encore composé capable de libérer, de favoriser ou d'induire la formation de NO dans les cellules, associé dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20

25



Fig.1

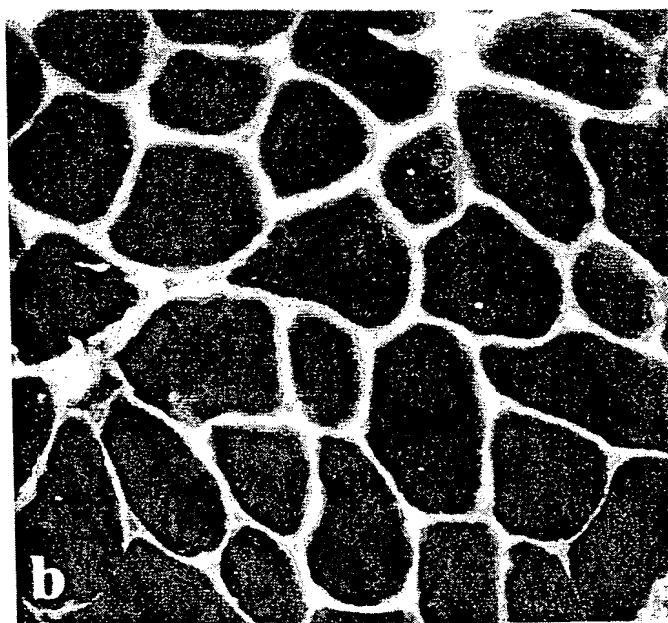
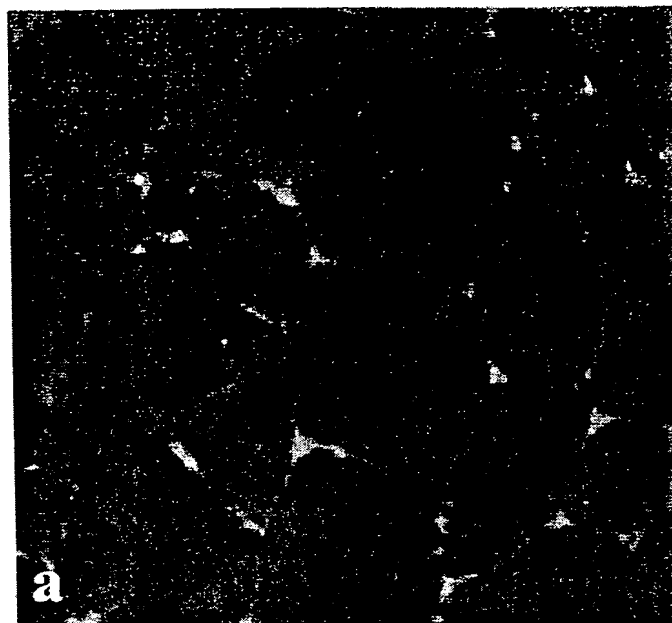




Fig.1 Suite

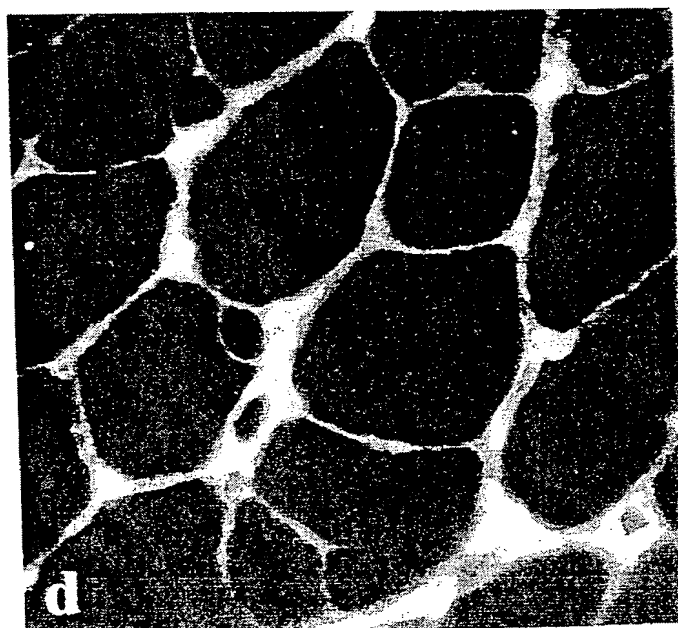
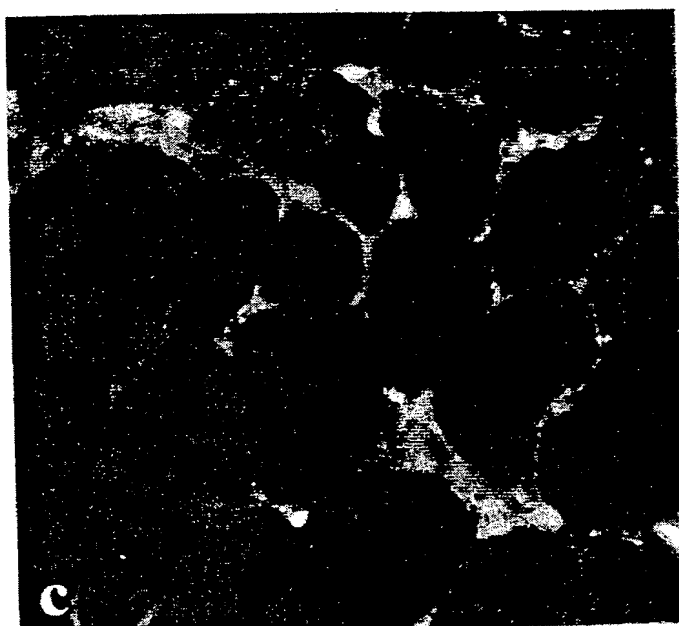




Fig.2 A NXLT

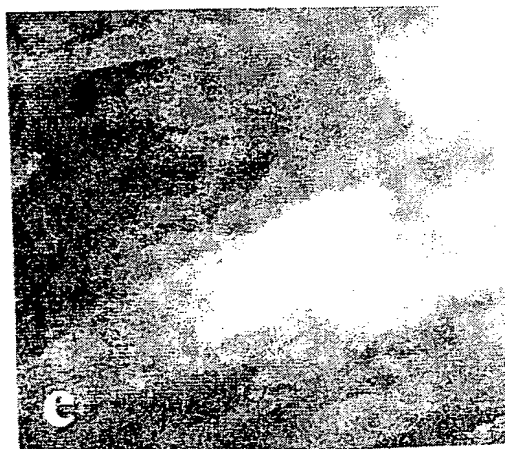
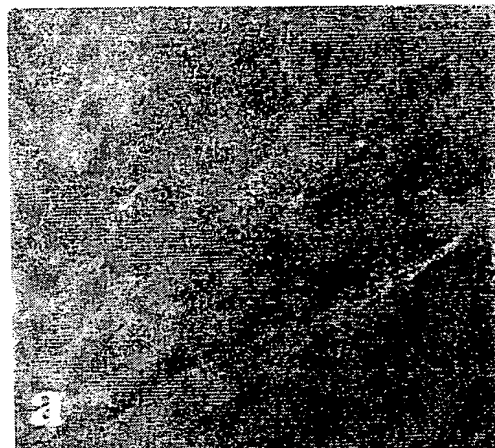




Fig.2 A NXLT Suite

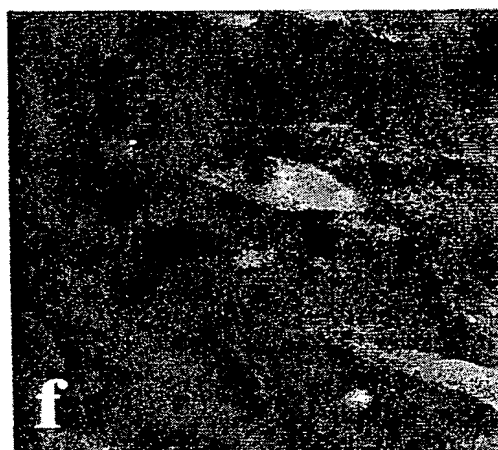




Fig.2 A NXLT Suite





Fig.2 B XLT

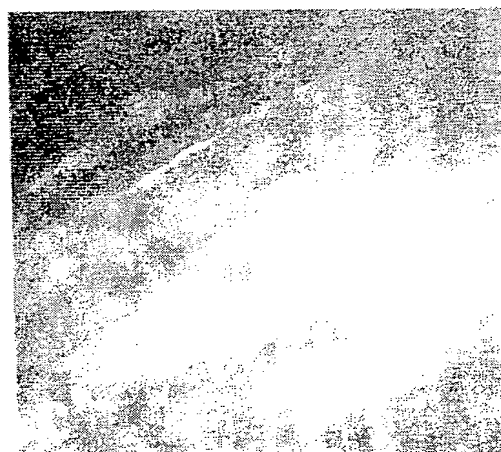
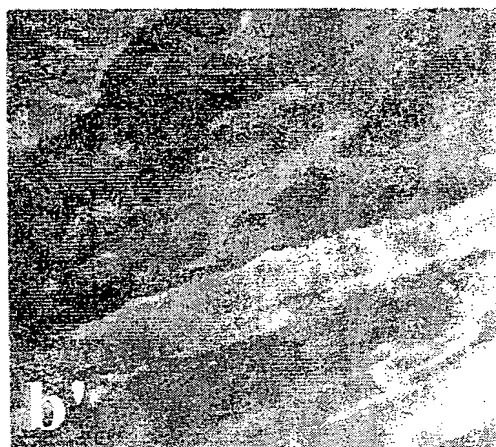




Fig.2 B XLT Suite

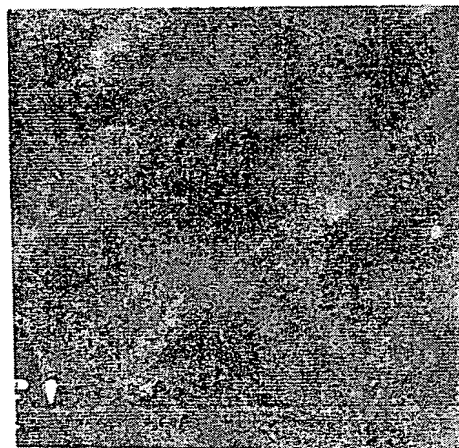
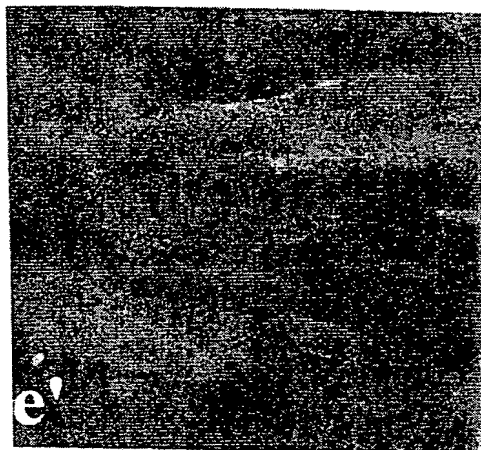




Fig.2 B XLT Suite

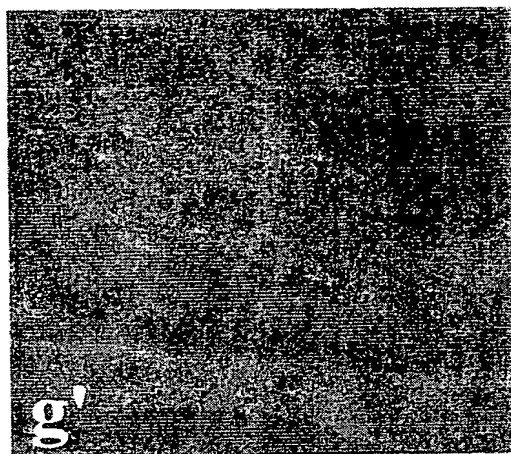




Fig.3

